

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**EDUARDA SGARIONI**

**PROSPECÇÃO DE AGRUPAMENTOS GÊNICOS CONSERVADOS  
ASSOCIADOS À SÍNTESE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM  
FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**Porto Alegre, 2021  
EDUARDA SGARIONI**

**PROSPECÇÃO DE AGRUPAMENTOS GÊNICOS CONSERVADOS  
ASSOCIADOS À SÍNTESE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM  
FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como um dos requisitos necessários à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia com habilitação em Biotecnologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Charley Christian Staats

Co-orientador: Dr. Nicolau Sbaraini Oliveira

Porto Alegre, 2021

Esse trabalho foi desenvolvido na Unidade de Biologia Teórica e Computacional, no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Eliane Maria Corso Sgarioni e Gelso Sgarioni, por colocarem meus sonhos em primeiro lugar e prezarem por minha educação abrindo inúmeras portas para que eu conseguisse chegar até aqui; por acreditarem em mim; por todo apoio, carinho e amor.

As minhas irmãs Amanda Sgarioni e Bruna Sgarioni, por estarem ao meu lado me apoiando e alegrando durante toda minha graduação.

Ao meu anjo da guarda, Damon (*in memoriam*), que foi meu melhor amigo quando eu não tinha ninguém, que me salvou de mim mesma e encheu minha vida de amor e alegria.

Ao meu namorado, Gustavo Rodrigues Lima, por estar do meu lado me apoiando e auxiliando, por não se importar de virar noites me ouvido reclamar e me ensinado python e R e, principalmente, por me amar incondicionalmente.

Ao meu orientador, Charley Christian Staats, e meu co-orientador, Nicolau Sbaraini Oliveira, por toda a paciência, troca de conhecimento e suporte durante esse período.

## RESUMO

Os fungos entomopatogênicos são importantes patógenos naturais de artrópodes, desempenhando um papel essencial no controle de diversas populações destes animais. O potencial destes fungos como agentes de controle biológico têm sido amplamente explorado. O ciclo de infecção destes organismos é dependente de uma grande diversidade de determinantes de virulência, sendo que a grande maioria dos determinantes de virulência já caracterizados para estas espécies é de origem proteica. Entretanto, uma grande diversidade de metabólitos secundários, moléculas de baixo peso molecular com potencial bioativo, podem também ter participação neste processo. Apesar da sua importância, poucos metabólitos secundários com potencial inseticida já foram relatados e caracterizados. Nesse trabalho, realizamos uma análise de genômica comparativa com o objetivo de identificar agrupamentos gênicos responsáveis pela biossíntese de metabólitos secundários no genoma de 37 espécies de fungos entomopatogênicos da ordem Hypocreales. Notavelmente, as espécies investigadas apresentam uma grande diversidade de genes envolvidos na biossíntese destes compostos, a qual, potencialmente, propicia um perfil metabólico único, o que pode ser um reflexo das distintas estratégias de adaptação observadas nessas espécies. Além disso, alguns agrupamentos gênicos identificados estão presentes na grande maioria das espécies avaliadas, o que indica que esses compostos têm um papel importante nos diferentes estilos de vida desses fungos e podem produzir compostos importantes para a manutenção do ciclo de vida e infecção desses fungos. Considerando que alguns agrupamentos são conservados entre a maioria das 37 espécies de fungos entomopatogênicos da ordem Hypocreales eles podem representar uma fonte de moléculas importantes para aplicação no desenvolvimento de novos inseticidas e, portanto, sua melhor investigação pode auxiliar em implementações mais eficazes do controle biológico.

## **ABSTRACT**

Entomopathogenic fungi are natural pathogens of arthropods, playing an important role in controlling insect populations. Their use as biological control agents has been widely explored. The infectious process is dependent on several virulence determinants and most virulence determinants already characterized for these species are proteins. However, a great diversity of secondary metabolites, bioactive low molecular mass molecules, may also have a role in this process. Despite its importance, few entomopathogenic-derived secondary metabolites harboring insecticidal activity have been reported and characterized. In this work, we performed a comparative genomic analysis of biosynthesis gene clusters, potentially involved in the synthesis of secondary metabolites, in the genome of 37 species of entomopathogenic fungi from Hypocreales order. Notably, the species investigated have a great diversity of genes involved in the biosynthesis of these compounds, which, potentially, provides a unique metabolic profile. This different profile may be the result of the different adaptation strategies observed in these species. In addition, some biosynthetic gene clusters were found conserved in several investigated species, which indicates that the potential compounds could have an important role in the maintenance of the life cycle and infection of these fungi. Furthermore, these conserved BGCs may represent a source of important molecules for application in the insecticidal development. Thus, these genes are interesting targets for future studies and can assist in more effective implementations of biological control strategies.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	4
RESUMO.....	5
ABSTRACT .....	6
1 INTRODUÇÃO.....	8
1.1 O INTERATOMA DOS FUNGOS.....	8
1.2 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS.....	9
1.2.1 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS DA ORDEM HYPOCREALES.....	10
1.3 CONTROLE BIOLÓGICO NOS AGROECOSSISTEMAS .....	12
1.4 METABOLISMO SECUNDÁRIO DOS FUNGOS.....	14
1.4.1 POLICETÍDEOS .....	16
1.4.2 PEPTÍDEOS DE BIOSÍNTESE NÃO RIBOSSÔMICA.....	17
1.4.3 HÍBRIDOS .....	18
1.4.4 TERPENOS.....	18
1.4.5 INDOLS .....	19
2 JUSTIFICATIVA.....	20
3 OBJETIVOS .....	21
3.1 OBJETIVO GERAL.....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4 RESULTADOS .....	22
5 DISCUSSÃO .....	55
6 REFERÊNCIAS .....	58

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O INTERATOMA DOS FUNGOS

A biosfera é constituída por uma rede de interações adaptativas que suportam o funcionamento dos ecossistemas, sendo estas interações moldadas por processos ecológicos e evolutivos (Andrade-Domínguez et al., 2014; Fonseca et al., 2017). Associações intra e interespecíficas, variando de mutualísticas a patogênicas, foram estabelecidas por meio da interação destes organismos e estratégias co-evolutivas, de maneira a suportar a subsistência, tanto de patógenos como de hospedeiros (Andrade-Domínguez et al., 2014; Fonseca et al., 2017).

Os fungos são organismos cosmopolitas que coabitam, com inúmeras espécies, diversos ecossistemas (Cantrell et al., 2011). A plasticidade de crescimento, de vias metabólicas, assim como de estruturas morfológicas, encontradas em fungos, permite que estes organismos colonizem os mais diversos ambientes, incluindo os extremos (Gadd, 2017; Kendrick, 2011). Em vista disso, ao longo da evolução, estes organismos estabeleceram relações mutualísticas com uma grande diversidade de organismos, como, por exemplo, bactérias, plantas, insetos e animais. Adicionalmente, algumas espécies fúngicas apresentam associações parasitárias ou patogênicas com quase todos os táxons de plantas e animais (Kendrick, 2011). Sendo essas interações fundamentais para a manutenção dos ecossistemas (Kendrick, 2011).

Dentre as funções ecológicas mais significativas exercidas por fungos, destaca-se a decomposição da matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes (Kendrick, 2011). Realizadas, primordialmente, por fungos saprófitos que, por intermédio da secreção de enzimas hidrolíticas e oxiredutoras, decompõem moléculas complexas de resíduos vegetais e animais em moléculas de menor complexidade estrutural, as quais podem ser aproveitadas por outros organismos. Adicionalmente, ocasionam a liberação de CO<sub>2</sub>, vital para o fluxo de carbono entre o solo e a atmosfera (Crowther et al., 2012; Kendrick, 2011). No entanto, a importância dos fungos para a ciclagem de nutrientes vai muito além dessas atividades centrais (Gadd, 2017). Alguns fungos estão envolvidos na ciclagem de outras substâncias, como compostos organometálicos,



organomercuriais, entre outros xenobióticos, apresentando grande importância ambiental e potencial biotecnológico (Gadd, 2017).

A associação simbiótica entre fungos micorrízicos e raízes de plantas parece ter sido um fator determinante na colonização do ambiente terrestre pelas plantas, visto que mais de 90% das espécies de plantas apresentam associações simbióticas mutualísticas com tais organismos (Lanfranco et al., 2017; B. Wang & Qiu, 2006). Nessa relação ambos são beneficiados: a planta hospedeira fornece compostos de carbono para o simbiote; enquanto, os fungos micorrízicos fornecem maior acesso aos nutrientes inorgânicos, melhora na absorção de água e aumento da tolerância a estresses ambientais diversos (Gadd, 2017; Lanfranco et al., 2017). Além disso, o microbioma das raízes das plantas, que envolve, não só interações micorrízicas, mas também com bactérias e outros fungos, é fundamental para a sobrevivência e desenvolvimento da vegetação, visto que a microbiota auxilia na absorção de nutrientes e modula a interação com potenciais patógenos, mediante competição, produção de compostos tóxicos e estimulação do sistema imune da planta (Berendsen et al., 2012). De forma similar, a microbiota animal - presente em diferentes nichos do corpo - é capaz de auxiliar na absorção de nutrientes, prevenindo a colonização e o estabelecimento de patógenos, e modulando aspectos do sistema imune (Althani et al., 2016).

Uma série de adaptações em indivíduos associados a variados táxons de fungos forneceu a capacidade de infectar e formar associações com os eucariontes mais diversos e difundidos do planeta: os insetos (Hughes & Ara, 2016). Essas associações incluem relações mutualísticas, onde os fungos auxiliam na nutrição dos insetos, até patogênicas com papel importante no controle da população de insetos (Hughes & Ara, 2016; Stefanini, 2018).

## 1.2 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Os fungos entomopatogênicos são representados por um conjunto de espécies biologicamente heterogêneas, distribuídas entre os filos Entomophthoromycota, Blastocladiomycota, Microsporidia, Basidiomycota e Ascomycota (Hughes & Ara, 2016; Shang et al., 2015; Wang & Wang, 2017). Tais fungos são capazes de infectar tanto insetos de corpo mole quanto duro,

além de uma diversidade de outros artrópodes, sendo, portanto, considerados os principais patógenos naturais de artrópodes (Lacey et al., 2015). A interação entre fungos entomopatogênicos e seus hospedeiros artrópodes é um processo complexo, composto por uma série de etapas que, quando exitoso, resulta na morte do hospedeiro (Wang & Wang, 2017). Em vista disso, essas espécies têm sido amplamente investigadas como agentes de controle biológico para artrópodes de importância agrícola (Abolins et al., 2007; Charnley, 2007; Shah & Pell, 2003).

O potencial entomopatogênico fúngico evoluiu independentemente e continuamente em muitas linhagens distintas, tal que os fungos entomopatogênicos não constituem um grupo monofilético (Hughes & Ara, 2016; Humber, 2008; Lovett & Leger, 2017; Shang et al., 2016). Esses organismos sofreram inúmeras diversificações ao longo da evolução por isso, apresentam expressivas distinções quanto a características genômicas, espectro de hospedeiros, ciclo de infecção e estratégias patogênicas (Lovett & Leger, 2017; Shang et al., 2015; Wang & Wang, 2017). Em vista disso, as interações fungo-hospedeiro são consideradas heterogêneas e dinâmicas, o que dificulta comparações entre fungos que infectam diferentes insetos. No entanto, alguns determinantes presentes no genoma dos fungos são indicativos do potencial entomopatogênico, como, por exemplo: (i) expansões em famílias de genes codificantes de enzimas importantes no processo de infecção, como proteases, quitinases e lipases - já que, geralmente, tal processo requer a penetração através da cera epicuticular, composta por lipídios e hidrocarbonetos, e posteriormente através da cutícula, rica em proteínas e quitina; e (ii) do espectro de hospedeiros, já que se observa uma correlação entre adaptação à colonização de múltiplos hospedeiro e otimização de códons em genes envolvidos na virulência (Badet et al., 2017; Lovett & Leger, 2017; Wang & Wang, 2017).

### 1.2.1 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS DA ORDEM HYPOCREALES

A ordem Hypocreales abriga o maior número de espécies de fungos entomopatogênicos, sendo que tais espécies são capazes de produzir uma ampla gama de metabólitos secundários (MSs) estruturalmente diversos que atuam como fatores de virulência, modulando as interações entre fungo e

hospedeiro (Zhang et al., 2020). Os fungos desta ordem infectam seus hospedeiros por meio da adesão de conídios na superfície externa dos artrópodes. Estes conídios, em condições ambientais apropriadas, germinam (Shin et al., 2020), ocorrendo então o desenvolvimento de estruturas especializadas que permitem, por meio da combinação entre secreção de enzimas hidrolíticas e pressão mecânica, a penetração da cutícula e a entrada na hemocele. Neste ambiente, o fungo deve evadir a resposta imune do hospedeiro, o qual irá reagir encapsulando as células fúngicas invasoras e melanizando o tecido fúngico e áreas adjacentes (Chandler, 2017; Shin et al., 2020; Zhang et al., 2020). No processo de evasão, alterações morfológicas ocorrem na terminação das hifas, dando origem a pequenos corpos hifais semelhantes a leveduras, conhecidos como blastosporos. Além disso, essas estruturas favorecem a rápida dispersão na hemolinfa do hospedeiro. Eventualmente ocorre a morte do hospedeiro - resultado do dano físico, da mudança comportamental e da ação de determinantes de virulência -, seguida da produção de conídios na superfície do hospedeiro que serão dispersos ao ambiente, majoritariamente, pela ação da água e vento (Chandler, 2017; Shin et al., 2020; Zhang et al., 2020; Zimmermann, 2007).

Durante todo o processo de infecção, especialmente na fase de colonização, o fungo produz uma série de metabólitos secundários capazes de auxiliar na infecção e colonização do hospedeiro e, também, suprimir o desenvolvimento de outros microrganismos (Chandler, 2017). O perfil de metabólitos secundários sintetizados varia entre espécies e linhagens, sendo que tal variação tem grande impacto no sucesso da infecção, já que essas moléculas estão envolvidas na virulência e assimilação de nutrientes (Bills & Gloer, 2017). Outro fator determinante para que a infecção ocorra com êxito é a defesa do inseto em resposta ao patógeno que acontece, majoritariamente, por alterações comportamentais e respostas imunes durante a infecção (Roy et al., 2006). Dentre as alterações comportamentais que podem levar a resistência ao patógeno podem ser citadas as práticas de higienização do ninho e indivíduos, e a febre comportamental (Roy et al., 2006; Tragust et al., 2013).

### 1.3 CONTROLE BIOLÓGICO NOS AGROECOSSISTEMAS

A introdução de artrópodes em novos agroecossistemas frequentemente resulta em desequilíbrios ambientais, visto que, tais organismos, são versáteis e cosmopolitas. Nestes novos ambientes, esses artrópodes podem se estabelecer e prosperar, já que é um local onde seus predadores naturais geralmente não habitam, atingindo altos níveis de densidade populacional e status de praga (McLaughlin & Dearden, 2019). O controle e manejo dessas populações de insetos invasores pode ser extremamente complexo, ameaçando seriamente a saúde humana, o meio ambiente e a agricultura com consequências ecológicas, ambientais e econômicas em decorrência do uso de estratégias de controle químico destas pragas (McLaughlin & Dearden, 2019).

Os danos às plantações causados por artrópodes-pragas podem ser intransponíveis (Bradshaw et al., 2016; McLaughlin & Dearden, 2019). Estima-se que estes organismos sejam responsáveis pela redução da produção agrícola mundial em cerca de 10 a 16%, antes da colheita, e perdas em escala similar pós-colheita, causando um mínimo estimado de US\$ 70 bilhões/ano em prejuízos à agricultura, bens e serviços (Bradshaw et al., 2016). Além disso, os custos futuros tendem a aumentar à medida em que os artrópodes ampliem suas fronteiras de dispersão em resposta a fatores como mudanças climáticas e desenvolvimento de resistência às estratégias de controle convencionais (Bradshaw et al., 2016; McLaughlin & Dearden, 2019).

Os defensivos agrícolas são produtos químicos ampla e globalmente empregados cujo objetivo é prevenir e/ou erradicar as pragas agrícolas, reduzindo assim as perdas na produção agrícola (McLaughlin & Dearden, 2019). Embora eficazes na redução da densidade de insetos invasores, o uso indiscriminado destas moléculas tem uma série de efeitos prejudiciais para outros organismos e ambientes (Abbas et al., 2015; Edwards et al., 2017; McLaughlin & Dearden, 2019; Tudi et al., 2021). Os pesticidas podem afetar organismos não-alvo, através do contato direto, bem como impactos indiretos, ao se transferirem para outras espécies na cadeia alimentar (McLaughlin & Dearden, 2019; Tudi et al., 2021). Somado a isso, a contaminação do solo por defensivos agrícolas é um problema generalizado com impactos adversos na

qualidade dos alimentos e na sustentabilidade agrícola. Tal contaminação pode, até mesmo, ser danosa aos microrganismos presentes no solo. Estes potenciais poluentes podem se disseminar para a atmosfera, águas superficiais e subterrâneas, afetando a qualidade da água potável, bem como a fauna e flora (Aktar et al., 2009; Tudi et al., 2021). Além disso, as estratégias de controle de artrópodes através de defensivos químicos apresentam curta duração, exigindo constantes reaplicações a cada estação de crescimento, contribuindo para o acúmulo destas moléculas no ambiente, e para o surgimento de artrópodes resistentes (McLaughlin & Dearden, 2019).

O controle biológico vem se mostrando uma estratégia superior aos defensivos agrícolas para manter a produtividade agrícola, bem como a economia e a saúde ambiental, visto que tal alternativa é ambientalmente menos impactante e pode ser utilizada para controlar artrópodes resistentes aos pesticidas (Peshin & Dhawan, 2009). O biocontrole ocorre naturalmente em qualquer ecossistema, sendo uma forma de manter o equilíbrio populacional próprio do ambiente (Eckstein et al., 2020). Contudo, podem ser empregadas estratégias direcionadas para facilitar o controle de populações com status de praga, por meio da introdução controlada e proposital, de uma nova espécie ou linhagem controladora (Eckstein et al., 2020). Essa população controladora pode manter relações de predação, parasitismo, herbivoria e competição para controlar a população alvo (Eckstein et al., 2020).

Tendo em vista que a premissa do biocontrole é o controle de pragas a partir do uso de seus inimigos naturais, os fungos entomopatogênicos apresentam um potencial crescente como agentes de controle biológico, sendo já empregados em áreas agrícolas para o controle de artrópodes-pragas (Faria & Wraight, 2007; Schrank & Vainstein, 2010). A produção de metabólitos secundários com ação inseticida por algumas espécies de fungos entomopatogênicos pode ser determinante para sua atuação como um potente agente de biocontrole (Liu & Tzeng, 2012; Wang & Xu, 2012). Nesse sentido, a investigação dos fatores genéticos e biológicos, envolvidos nos mecanismos de colonização dos seus hospedeiros, pode auxiliar em implementações mais eficazes destes organismos como agentes de controle biológico (Molnár et al., 2010).

## 1.4 METABOLISMO SECUNDÁRIO DOS FUNGOS

Diferentemente do metabolismo primário que é responsável pela síntese de moléculas envolvidas ativamente no crescimento, desenvolvimento e reprodução, o metabolismo secundário dos fungos produz moléculas orgânicas de baixa massa molecular e, geralmente, bioativas. Tais moléculas podem atuar como fatores de virulência, agentes de competição, mitigadores de estresse bióticos e abióticos, entre outros, proporcionando vantagens ambientais a estes organismos (Keller, 2015; Krause et al., 2018; Molnár et al., 2010). Apesar de as vias do metabolismo primário e secundário serem distintas, as mesmas estão intrinsicamente interligadas, já que os metabólitos secundários são derivados das vias metabólicas centrais, sendo formados quando precursores específicos do metabolismo primário se acumulam (Keller et al., 2005). No entanto, a produção de certos MSs, como policetídeos, está restrita a táxons específicos em fungos, predominando entre os fungos filamentosos da classe Ascomycota o que sugere ainda mais a diversificação e especificação de MSs em distintas espécies (Keller, 2019).

Os metabólitos secundários apresentam atividades bastante diversas, alguns dos quais se destacam no meio comercial (Keller et al., 2005). Dentre os MSs isolados com potencial na indústria, chamam atenção aqueles que revolucionaram a medicina, como as penicilinas e seus derivados, com atividade antibiótica; ciclosporinas com atividade imunossupressora; equinocandinas com atividade antifúngica; e, estatinas utilizadas em tratamentos para a hipercolesterolemia (Bennett & Chung, 2001; Dunn et al., 2001; Golomb & Evans, 2010; Morrison, 2006). Muitos MSs com atividades de interesse, tanto a nível científico quanto comercial, já foram isolados de culturas de fungos entomopatogênicos (Molnár et al., 2010). Alguns exemplos de MSs sintetizados por tais fungos são as destruxinas (atuam como fatores de virulência e apresentam atividades antitumoral, antiviral, citotóxica, imunossupressora, fitotóxica, antiproliferativa e inseticida), a beauvericina (atua como ionóforo e, também, apresenta atividade inseticida, citotóxica e antibiótica), a bassinolida (apresenta propriedades antibióticas e ionóforas), a oosporeína (apresenta atividade antibiótica) e a basiacidina (apresenta atividade inseticida) (Chandler, 2017).

Os genes responsáveis pela biossíntese de metabólitos secundários são, frequentemente, organizados em agrupamentos gênicos (*biosynthetic gene clusters*). Ao que tudo indica, tal arranjo favorece a perpetuação dos genes envolvidos na biossíntese de MSs, posto que, sua disseminação é altamente dependente de eventos de transferência horizontal gênica (Walton & Walton, 2000). Esses agrupamentos podem incluir, além do gene que codifica a enzima central na biossíntese (também conhecido como *backbone gene/core-gene/gene-chave*), genes codificados de proteínas envolvidas no amadurecimento e transporte do MSs, além de genes que conferem proteção contra produtos tóxicos do *cluster* (Keller, 2019).

A síntese desses compostos envolve, de modo geral, duas etapas. Na primeira etapa, ocorre a polimerização de precursores, derivados do metabolismo primário, por enzimas codificadas pelos gene-chave (Keller, 2019). Na segunda etapa, ocorre o amadurecimento dos metabólitos gerados, por meio da ação das enzimas adicionais anteriormente descritas (Keller, 2019). Tal etapa de amadurecimento pode alterar a bioatividade dos metabólitos (Keller, 2019). Dentre as classes de MSs mais comumente encontrados em fungos do filo Ascomycota podem ser citados os policetídeos (PKs; sintetizados através da ação de policetídeo sintases), os peptídeos de biossíntese não ribossômica (NRPs; sintetizados através da ação de peptídeo sintetases não ribossômicas), os híbridos (PKS-NRPS; sintetizados através da ação de enzimas mistas, parte policetídeo sintases, parte peptídeo sintetases não ribossômicas), os terpenos (TERP; sintetizados através da ação de terpeno ciclases [TCs]), e os INDOLS (IND; sintetizados através da ação de preniltransferases [PTs], também chamadas de dimetilalil triptofano sintase [DMATS]) (Inglis et al., 2013; Keller, 2019).

O controle do metabolismo secundário dos fungos é bastante complexo e envolve uma série de etapas regulatórias, a fim de garantir que a biossíntese ocorra em resposta ao metabolismo celular e à presença de estímulos específicos (Garc et al., 2018; Keller, 2019; Yin & Keller, 2011). A regulação transcricional dos genes envolvidos na biossíntese de MSs é realizada por (i) fatores de transcrição específicos que, frequentemente, estão contidos nos agrupamentos gênicos; (ii) fatores de transcrição globais que respondem a

fatores ambientais, como sinais nutricionais, temperatura e pH; (iii) complexos heteroméricos codificados por genes que não estão presentes nos agrupamentos gênicos; (iv) outras regiões regulatórias dos agrupamentos (*in-cluster regulators*); e (v) modificações epigenéticas (Garc et al., 2018; Keller, 2019; Sbaraini et al., 2019; Yin & Keller, 2011).

A disponibilização de sequências genômicas de fungos filamentosos revelou que estas espécies são capazes produzir uma gama muito maior de MSs do que até então constatado, evidenciando a dependência de estímulos ambientais específicos para a ativação transcricional dos agrupamentos gênicos (Keller, 2019). Tendo em vista que os MSs apresentam atividades inseticidas, modulatórias do sistema imunológico, antimicrobianas e citotóxicas, as quais são de relevância científica e comercial, ferramentas de bioinformática capazes de acelerar a identificação de novos metabólitos fúngicos são de extrema importância (Keller et al., 2005; Molnár et al., 2010). Estas ferramentas vão permitir estudos posteriores, a fim de caracterizar estes compostos, rotas de síntese e atividades biológicas (Keller, 2019; Keller et al., 2005; Molnár et al., 2010).

#### 1.4.1 POLICETÍDEOS

A classe dos policetídeos compreende um vasto conjunto de moléculas estruturalmente diversas, derivadas de monômeros de ácido carboxílico. A biossíntese destes compostos (mediada pelas policetídeo sintases - PKSs) ocorre através de repetidos ciclos de reação de condensação de Claisen seguida de descarboxilação até atingir um comprimento definido da cadeia quando, então, o substrato é liberado (Molnár et al., 2010). O esqueleto de carbono resultante pode sofrer ciclização, clivagem C-C e reações de rearranjo, seguido de reações adicionais como glicosilação, alquilação e hidroxilação modificando a estrutura do policetídeo (Hertweck, 2009). Diversos policetídeos foram isolados e funcionalmente caracterizados, dentre tantos com interesse científico e econômico estão as aflatoxinas – contaminantes de grãos com alta toxicidade para humanos e animais; lovastatina – fármaco usado no tratamento da hipercolesterolemia; e a griseofulvina – fármaco usado no tratamento de infecções micóticas (Bennett & Chung, 2001; Kensler et al., 2011; Petersen et al., 2014; Sabatini et al., 2018).



As PKSs do tipo I, caracterizadas por apresentar domínios catalíticos arranjados de forma linear e ligados covalentemente dentro de grandes enzimas multidomínios e encontradas na maioria dos fungos do filo Ascomycota, são capazes de produzir compostos que variam de estruturas monocíclicas relativamente simples a moléculas policíclicas altamente complexas e compostos lineares altamente reduzidos (Hertweck, 2009). Estes domínios funcionam de forma interativa, sendo que três são altamente conservados nas enzimas deste tipo: (i) ceto-sintase, KS, responsável por catalisar as etapas de condensação; responsável por unir covalentemente acila e os intermediários gerados; (ii) acil-transferase, AT, responsável por transferir unidades de acila ao grupo prostético da ACP; (iii) proteína carreadora de acil, ACP (Molnár et al., 2010; Sabatini et al., 2018). Algumas policetídeo sintases de tipo I não são capazes de reduzir os grupos  $\beta$ -carbonil e, portanto, apresentam domínios complementares, sendo eles: domínio inicial de acil transferase (SAT) que fornece os percursos de iniciação da cadeia; domínio de modelagem de produto (PT) que orienta a cadeia nascente em direção a ciclização, originando policetídes aromáticos (Molnár et al., 2010; Sabatini et al., 2018). Por outro lado, policetídeo sintases de tipo I capazes de reduzir os grupos  $\beta$ -carbonil apresentam um subconjunto de domínios redutores complementares com processamento variável, podendo ser: cetorreductores (KR), que produzem álcool; desidratase (DH), que removem água formando alcanos; e, enoil reductase (ER) que reduz a ligação dupla. Além disso, domínio de metiltransferases (MeT) e de tioesterase (TE) podem também estar presentes (Molnár et al., 2010; Sabatini et al., 2018).

#### 1.4.2 PEPTÍDEOS DE BIOSÍNTESE NÃO RIBOSSÔMICA

Apesar de serem menos frequentes nos genomas dos fungos filamentosos do que os policetídeos, os peptídeos de biossíntese não ribossômica (NRPs) apresentam uma grande diversidade, sendo amplamente utilizados na saúde humana como antibacterianos, antitumorais, antifúngicos e também como aditivos na nutrição animal (Süssmuth & Mainz, 2017).

A biossíntese dos NRPs é catalisada pelas NRPSs - complexos de enzimas multidomínio que atuam por intermédio de módulos realizando a ativação e o acoplamento de um único aminoácido a cadeia nascente. Os precursores dos

NRPs vão desde os 23-alfa-aminoácidos canônicos, até outros aminoácidos não proteínogênicos e ácidos ceto ou hidróxi carboxílicos. Cada módulo é constituído por três domínios principais: (i) adenílação (A), responsável pelo reconhecimento do substrato e ativação; (ii) tiolação (T), responsável por ligar o peptídeo e transportar para outros domínios capazes de modificar a cadeia nascente; (iii) condensação (C), responsável por adicionar o precursor à cadeia nascente (Molnár et al., 2010; Süssmuth & Mainz, 2017). Adicionalmente, cada módulo pode apresentar domínios de modificação, como epimerização, formilação, metilação, oxidação, redução ou heterociclicização (Molnár et al., 2010; Süssmuth & Mainz, 2017). A liberação do peptídeo é catalisada pelo domínio de tioesterase, que, por sua vez, pode efetuar, quando necessário, a ciclização do produto final (Molnár et al., 2010; Süssmuth & Mainz, 2017).

#### 1.4.3 HÍBRIDOS

Os metabólitos secundários híbridos derivados de PKS-NRPS possuem importantes atividades biológicas, sendo que as duas enzimas para biossíntese podem estar separadas, como no caso da valactamida, ou fusionadas, como no caso do ácido tenuazônico (Keller, 2019). Curiosamente, os genes híbridos PKS-NRPS estão extensamente distribuídos entre os ascomicetos e são, frequentemente, compostos por um módulo de PKS altamente redutora (HR-PKS), que forma uma cadeia de policetídeo reduzida e, geralmente, C-metilada, e um ou mais módulos de NRPS, responsável por ativar um aminoácido que condensa com o policetídeo, gerando um intermediário de amida (Molnár et al., 2010). Após a liberação, esse intermediário é modificado por enzimas de amadurecimento, incluindo uma sintetase híbrida (Molnár et al., 2010).

#### 1.4.4 TERPENOS

A biossíntese dos terpenos faz parte do metabolismo primário, na qual a glicose é catabolizada em acetil-coenzima A que, por meio de rotas que conduzam a formação de isopentenil difosfato (IPP), originará os terpenos (Molnár et al., 2010). De forma geral, a partir da conversão em IPP, acontecem repetidas reações do tipo condensação cabeça-cauda que formam os compostos terpenóides. Quando tais reações geram metabólitos de cadeia aberta, enzimas terpeno sintase ou terpeno ciclase – dependentes de metal -

catalisam a reação de ciclização e, por fim, enzimas adicionais realizam o amadurecimento do composto gerando o composto terpenóide final (Molnár et al., 2010).

#### 1.4.5 INDOLS

Os fungos pertencentes ao filo Ascomycota são exímios produtores de alcalóides indólicos, que consistem em compostos orgânicos nitrogenados com uma grande variedade de funções biológicas (Xu et al., 2015). O metabolismo fúngico apresenta diferentes estratégias para a incorporação do indol nas estruturas alcalóides: (i) NRPs contendo indol, são produzidos quando um módulo NRPS incorpora um L-triptofano ao composto final, podendo ser classificado como peptídeo, dipeptídeo (sintetizado por uma NRPS bimodular, na qual L-triptofano é condensado com o segundo aminoácido para produzir um dipeptidil tioéster linear que pode sofrer ciclização intramolecular) ou tripeptídeo (sintetizado por uma NRPS trimodular, que além de incorporar o L-triptofano e outro aminoácido, frequentemente incorpora o antranilato de  $\beta$ -aminoácido); (ii) Alcalóides indólicos híbridos sintetizados a partir de PKS-NRPS, produzidos quando um módulo de NRPS capaz de inserir frações de indol está fusionado a PKS; (iii) Diterpenóides indólicos caracterizados por serem diterpenos cíclicos contendo indol; (iv) Alcalóides indólicos derivados de outros blocos de construção, produzidos quando outras moléculas derivadas de triptofano são usados na construção do indol (Xu et al., 2015).

## **2 JUSTIFICATIVA**

O controle biológico é uma alternativa promissora para o controle e manejo de pragas agrícolas, representando uma alternativa superior ao uso de agroquímicos, visto que é ambientalmente menos agressiva, eficaz e capaz de controlar pragas com resistência aos pesticidas atualmente empregados. Considerando que o metabolismo secundário destes organismos é uma vasta fonte de compostos bioativos com um enorme potencial a ser desvendado, investigar o metabolismo dos fungos entomopatogênicos pode ser uma fonte de novas moléculas de importância no desenvolvimento de novos fármacos e inseticidas. Além disso, compreender melhor o metabolismo secundário de fungos entomopatogênicos pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias de controle biológico mais efetivas.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Identificar e avaliar a conservação de agrupamentos gênicos associados à biossíntese de metabólitos secundários presentes nos genomas de fungos entomopatogênicos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar agrupamentos gênicos associados à síntese de metabólitos secundários nas sequências genômicas de 37 espécies de fungos entomopatogênicos;
- Avaliar, empregando ferramentas de genômica comparativa, a conservação dos agrupamentos gênicos identificados.

## **4 RESULTADOS**

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados na forma de um manuscrito científico confeccionado de acordo com o período BMC Genomics.

## **PROSPECTION OF CONSERVED BIOSYNTETIC GENE CLUSTERS IN ENTOMOPATHOGENIC FUNGI**

Eduarda Sgarioni<sup>1</sup>; Nicolau Sbaraini<sup>2</sup>; Charley Cristian Staats<sup>1,2, \*</sup>

<sup>1</sup>Curso de Graduação em Biotecnologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

\* Correspondence: Charley Christian Staats

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia. Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Bloco IV, Prédio 43421, Laboratório 219. Caixa Postal 15005. Porto Alegre, RS, Brasil, 91501-970. Tel: +55 51 3308 6080. Fax: +55 51 3308 7309. E-mail: [staats@ufrgs.br](mailto:staats@ufrgs.br)

## **ABSTRACT**

**Background:** Entomopathogenic fungi are natural pathogens of arthropods, playing an important role in controlling insect populations. Their use as biological control agents has been widely explored. The infectious process is dependent on several virulence determinants and the vast majority of virulence determinants already characterized for these species are of protein origin. However, a great diversity of secondary metabolites, potentially bioactive low molecular mass molecules, may also have a role in this process. Despite its importance, few entomopathogenic-derived secondary metabolites, harboring insecticidal activity, have been reported and characterized. In this work, we performed a comparative genomic analysis of biosynthesis gene clusters, potentially involved in the synthesis of secondary metabolites, in the genome of 37 species of entomopathogenic fungi of the order Hypocreales.

**Results:** Notably, the species investigated have a great diversity of genes involved in the biosynthesis of these compounds, which, potentially, provides a unique metabolic profile, which may be the result of the different adaptation strategies observed in these species. In addition, some biosynthetic gene clusters were found conserved in several investigated species, which indicates that these compounds have an important role in the different lifestyles of these fungi and can produce important compounds for the maintenance of the life cycle and infection of these fungi.

**Conclusions:** Considering that some BGCs are conserved among most of the 37 species of entomopathogenic fungi from Hypocreales order, they may represent a source of important molecules for application in the insecticidal development,



therefore, their better investigation in further studies can assist in more effective implementations of biological control.

**Keywords:**

Biosynthetic gene cluster; entomopathogenic fungi; secondary metabolites; comparative genomics

## BACKGROUND

Entomopathogenic fungi are represented by a set of biologically heterogeneous species distributed among the phyla Entomophthoromycota, Blastocladiomycota, Microsporidia, Basidiomycota, and Ascomycota (Hughes & Ara, 2016; Shang et al., 2015; Wang & Wang, 2017). Such species are capable of infecting both soft and hard body insects, in addition to a diversity of other arthropods (Lacey et al., 2015). The interaction between entomopathogenic fungi and their arthropod hosts is a complex process, composed of a series of stages that, when successful, results in the death of the host (Wang & Wang, 2017). This set of fungi do not constitute a monophyletic group since the fungic entomopathogenic potential has evolved independently and continuously in several different strains. Therefore fungi-host interactions are considered to be heterogeneous and dynamic, which negatively impact potential comparisons between fungi that infect different insects (Humber, 2008; Lovett & Leger, 2017; Shang et al., 2016).

The Hypocreales order holds the largest number of entomopathogenic fungi species, and all of them are capable of producing a wide range of structurally diverse secondary metabolites (SMs), which can modulate fungi-host interactions, thus being involved in the colonization process and acting as virulence factors (Zhang et al., 2020). Among the classes of SMs most commonly found in fungi from Ascomycota phylum are the polyketides (PKs; synthesized through the action of polyketide synthases); non-ribosomal peptides (NRPs; synthesized through the action of non-ribosomal peptide synthetases); hybrids (synthesized through the action of mixed enzymes); terpenes (TERP; synthesized through the action of terpene cyclases [TCs]); and INDOLS (IND; synthesized through the action of prenyltransferases [PTs], also called dimethylallyl tryptophan synthase [DMATS] (Inglis et al., 2013;

Keller, 2019). Genes responsible for the biosynthesis of SMs are often arranged into biosynthetic gene clusters (BGCs). These BGCs may include genes involved in the maturation and transport of SMs in addition to the core gene (Keller, 2019). The control of the secondary metabolism is complex and, to ensure that biosynthesis occurs in response to cellular metabolism or in the presence of specific stimuli, there are a series of regulatory steps (Garc et al., 2018; Keller, 2019; Yin & Keller, 2011). Thus, not only the profile but also the quantities of SMs may vary between species and even strains (Bills & Gloer, 2017).

The availability of genomic sequences of filamentous fungi revealed that these species can produce a much larger range of SMs than was previously known (Keller, 2019). This vast unexplored potential of cryptic metabolites cannot be accessed with the regular culture methods usually employed (Keller, 2019; Molnár et al., 2010). Bioinformatics tools are valuable resources in the identification of SM-associated gene clusters. Furthermore, the characterization of these cryptic compounds constitutes an important source of new bioactive molecules, and the prospection of entomopathogenic fungal derived-BGCs can constitute a strategy for the development of new insecticides. Here, we performed a comparative genomic survey of BGCs in 37 species of Hypocrealean entomopathogenic fungi, demonstrating that such BGCs displayed a complex pattern of distribution among such species.

## **RESULTS**

### **General features**

The genomic sequences of 37 Hypocrealean entomopathogenic fungi were recovered from NCBI (Additional Table 1). As most of them were drafts, we

performed a quantitative assessment of genome assembly and annotation completeness based on evolutionarily informed expectations of gene content using BUSCO (Simão et al., 2015). Except for 3 species (*Cordyceps pruinose*, *Ophiocordyceps camponoti-rufipedis*, and *Ophiocordyceps sinensis*), all explored genomes have estimated completeness greater than or equal to 95.0% (after the annotation step) according to BUSCO (Figure 1). This suggests that the available sequences represent a significant proportion of the actual genome, not affecting the BGC conservation analysis.

### **Biosynthetic Gene Clusters prediction**

For the detection of BGCs, a pipeline was encompassing several steps ranging from genome annotation to BGC assignment was generated (Additional Figure 1). This was necessary as several of the genomes herein analyzed did not contain an annotation. Summing the predicted BGCs of all 37 analyzed species, the genome survey identified a total of 2348 putative BGCs from eleven different classes: comprising 602 PKS, 491 NRPS, 137 hybrids, 273 terpenes, 225 indols, and 568 PKS or NRPS-like. Furthermore, other 57 identified BGCs comprise pathways for biosynthesis of siderophores, fungal-RiPPs, betalactones, or "others". The amount of putative BGCs predicted in each species and its classes are specified in Figure 2.

To evaluate if the number of BGCs among the fungal genomes would be associated with the genome size, a correlation analysis was performed based on the number of core genes. No correlation could be observed between the number of BGCs identified and the size of the fungal genome (Figure 3).

### **Conservation of Biosynthetic Gene Clusters**

To evaluate the putative conservation of BGCs among the fungal genomes

analyzed, we first focused on backbone genes. The conservation of BGCs varied between classes and, also, within classes, forming the different patterns of the graph (Figure 4; Additional Figure 2). At least one BGC of each category is conserved in all species analyzed, except for Siderophores, NRPSs, and hybrids. Moreover, the proportion of orphan genes varied in all classes (Figure 4), which highlights the potential chemodiversity of these fungal species. To further illustrate the conservation of BGCs, we select the top-10 BGCs from the main classes of SMs found in these fungi presenting the highest conservation among the analyzed species (Figure 5).

## **DISCUSSION**

Biological control is a promising strategy that aims to reduce the dependence on chemical pesticides, maintaining agricultural productivity and, consequently, economically, in an environmentally less impacting way (Peshin & Dhawan, 2009). Entomopathogenic fungi are important natural arthropod pathogens. These species have been widely explored as biological control agents and are already used in agricultural crop protection (Faria & Wraight, 2007; Schrank & Vainstein, 2010).

The process of infection of the arthropod host by the fungus consists of a series of steps that will culminate in the host's death (Wang & Wang, 2017). This process is dependent on a great diversity of virulence determinants, such as proteins and secondary metabolites (Keller, 2019; Wang & Wang, 2017; Zhang et al., 2020). However, most of the determinants already characterized for these species are of protein origin, with few secondary metabolites with insecticidal potential already reported and characterized (Wang & Wang, 2017). Considering that the order Hypocreales hosts numerous entomopathogenic fungi capable of producing

bioactive molecules (Zhang et al., 2020), we performed a comparative genomics analysis to identify gene clusters responsible for the biosynthesis of secondary metabolites in the genome of 37 species of fungi entomopathogens from the order Hypocreales.

The investigated species showed to be capable of synthesizing a unique profile of SMs, which may reflect the different adaptation strategies observed in these species (Bills & Gloer, 2017). In addition, the most abundant BGCs in the genomes are those belonging to the PKS, NRPS, TERP, and INDOL classes, which are the classes of SMs most found in fungi of the phylum Ascomycota (Inglis et al., 2013; Keller, 2019). Unlike what has been reported for bacteria from the *Nocardia* genus (Männle et al., 2020), no correlation was observed between the number of identified BGCs and the size of the fungus genome, this may be due to our analysis, which is more embracing and includes entomopathogenic fungi with different life strategies and host spectrum.

It was observed a variation in the conservation of the BGCs between the different classes of secondary metabolites, while the betalactone class was found to be the most conserved in the species of entomopathogenic fungi evaluated. However, this result could be overrated, since we have identified few clusters belonging to this class in the genomes. In addition, we detected a great variation in the conservation of BGCs within SM classes, which highlights the potential chemiodiversity of these species of fungi. However, at least one group of each category is conserved in all analyzed species, except for Siderophore, NRPS, and hybrids. It suggests that these compounds have an important role in the different lifestyles of these fungi.

It is well known that throughout the infection process, the fungus produces a series of secondary metabolites capable of assisting infection and colonization of the host (Chandler, 2017). These bioactive compounds can be involved in the virulence and assimilation of nutrients (Bills & Gloer, 2017; Chandler, 2017). Considering that some BGCs are conserved among most of the 37 species of entomopathogenic fungi, from Hypocreales order, such as PKS11, PKS29, Terpene4, Terpene9, Terpene24, Terpene47, Terpene58, Terpene74, DMATS2, DMATS3 and DMATS9, they may represent a source of important molecules for application in insecticidal development. Therefore, a better investigation in the most conserved BGCs in further studies can assist in more effective implementations of biological control.

## **CONCLUSION**

Some BGCs are conserved between the majority of the 37 Hypocrealean entomopathogenic fungi species, such as PKS11, PKS29, Terpene4, Terpene9, Terpene24, Terpene47, Terpene58, Terpene74, DMATS2, DMATS3 and DMATS9, and they may represent a source of important molecules for application in new insecticidal development.

## **METHODS**

### **Genome annotation and quality assessment**

All fungal genomes were downloaded from the NCBI Genome Database, and the descriptions and accession numbers are displayed in Additional Table 1. As most of the sequences were not annotated and to homogenize the data we opted to annotate all the sequences employing AUGUSTUS v3.2 (*Fusarium graminearum* was chosen as the model organism among the available species) as the gene predictor (Stanke et al., 2004). Next, the assessment of genome assembly and

annotation completeness was performed with BUSCO v.4 (Simão et al., 2015).

### **Biosynthetic Gene Clusters prediction and conservation**

Putative BGCs were identified with the antiSMASH v5.0 (Blin et al., 2019) and SMIPS (Wolf et al., 2016) algorithms. The conservation of predicted clusters in the 37 species of entomopathogenic fungi was assessed with BlastP (Altschul et al., 1997) based primarily on backbone gene conservation (among species from the same genus: query coverage >60 % and identity >60 %; among species from different genus: query coverage >50 % and identity >45 %) and are shown in Additional file 2.

### **CONFLICT OF INTERESTS**

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicial to the impartiality of the reported research.

### **REFERENCES**

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/genetics/156.4.1997>
- Bills, G. F., & Gloer, J. B. (2017). Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. *The Fungal Kingdom*, 1087–1119. <https://doi.org/10.1128/9781555819583.ch54>
- Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Lee, S. Y., Medema, M. H., & Weber, T. (2019). AntiSMASH 5.0: Updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W81–W87. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz310>

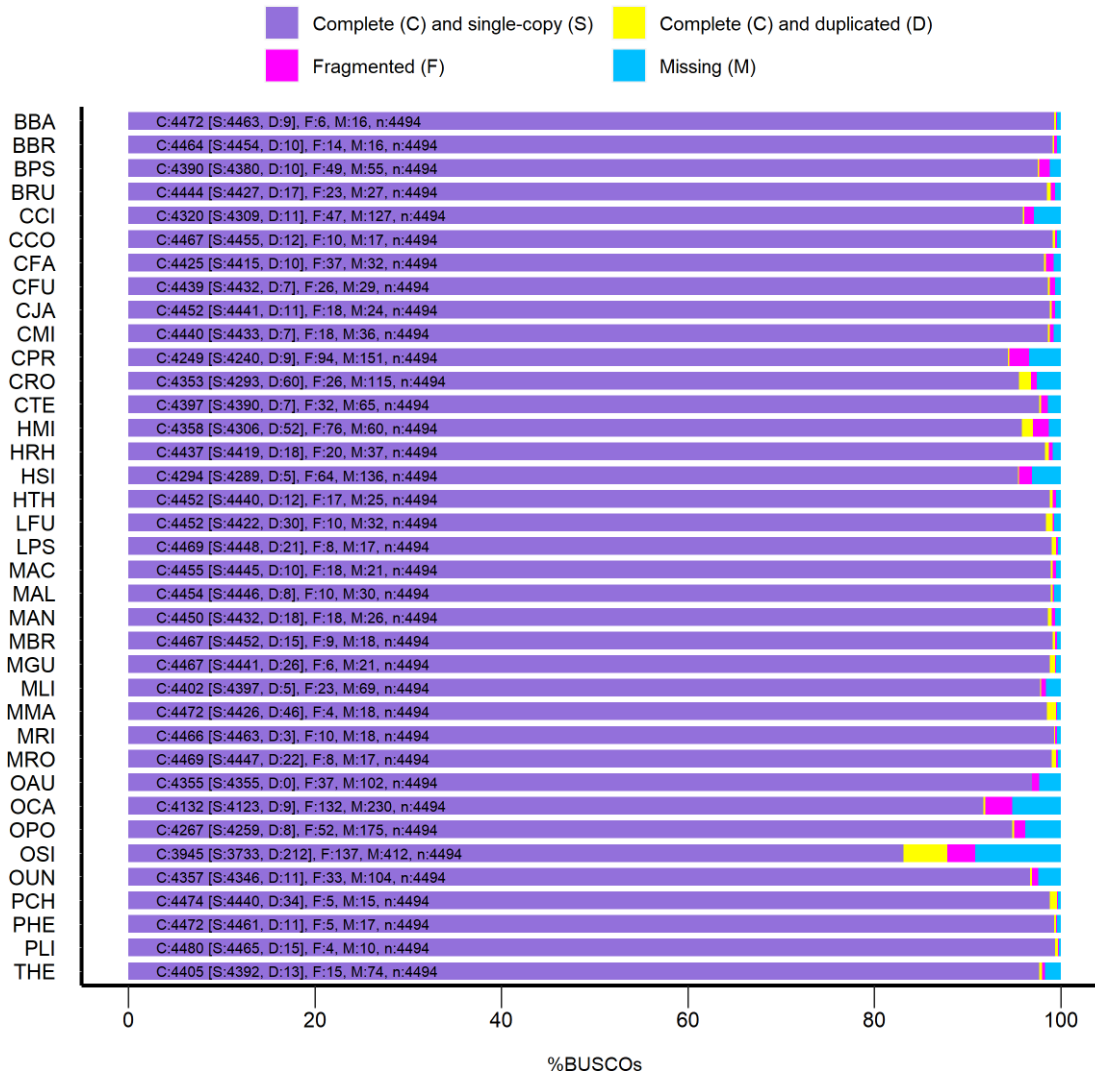


- Chandler, D. (2017). Basic and Applied Research on Entomopathogenic Fungi. In *Microbial Control of Insect and Mite Pests: From Theory to Practice*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803527-6.00005-6>
- Faria, M. R. d., & Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3), 237–256. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>
- Garc, C., Dom, R., & Kosalkov, K. (2018). *Transcription Factors Controlling Primary and Secondary Metabolism in Filamentous Fungi: The  $\beta$ -Lactam Paradigm*. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020047>
- Hughes, D. P., & Ara, J. P. M. (2016). *Diversity of Entomopathogenic Fungi: Which Groups Conquered the Insect Body?* 94, 1–39. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.01.001>
- Humber, R. A. (2008). Evolution of entomopathogenicity in fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3), 262–266. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.02.017>
- Inglis, D. O., Binkley, J., Skrzypek, M. S., Arnaud, M. B., Cerqueira, G. C., Shah, P., Wymore, F., Wortman, J. R., & Sherlock, G. (2013). *Comprehensive annotation of secondary metabolite biosynthetic genes and gene clusters of Aspergillus nidulans, A. fumigatus, A. niger and*
- Keller, N. P. (2019). Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 167–180. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0121-1.Fungal>
- Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M., & Goettel, M. S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the

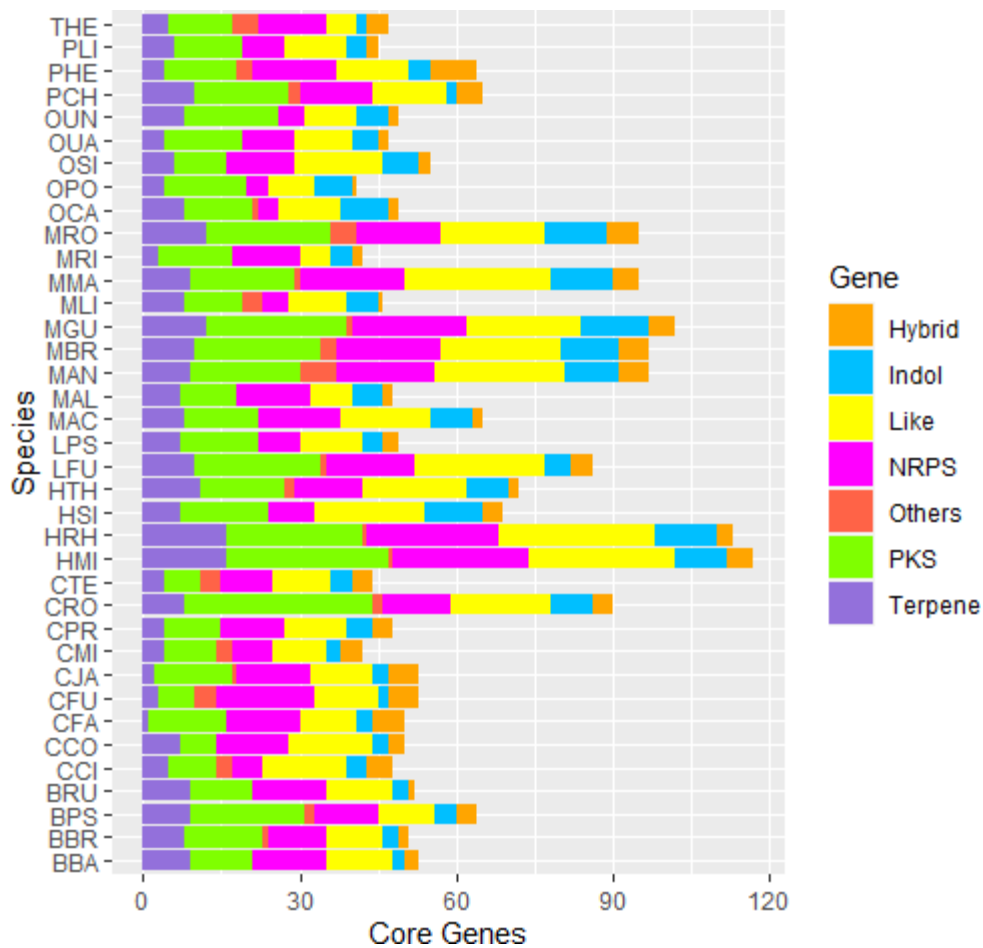
- future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 1–41.  
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>
- Lovett, B., & Leger, R. J. S. T. (2017). *The Insect Pathogens*. 1–19.
- Molnár, I., Gibson, D. M., & Krasnoff, S. B. (2010). Secondary metabolites from entomopathogenic Hypocrealean fungi. *Natural Product Reports*, 27, 1241–1275. <https://doi.org/10.1039/c001459c>
- Peshin, R., & Dhawan, A. K. (2009). Integrated Pest Management: Innovation-Development Process. In *Journal of Materials Processing Technology* (Vol. 1, Issue 1). New York Springer Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8992-3>
- Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2010). *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56(7), 1267–1274. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.008>
- Shang, Y., Feng, P., & Wang, C. (2015). *Fungi That Infect Insects : Altering Host Behavior and Beyond*. 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005037>
- Shang, Y., Xiao, G., Zheng, P., Cen, K., Zhan, S., & Wang, C. (2016). *Divergent and Convergent Evolution of Fungal Pathogenicity*. 8(5), 1374–1387.  
<https://doi.org/10.1093/gbe/evw082>
- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31(19), 3210–3212.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv351>
- Stanke, M., Steinkamp, R., Waack, S., & Morgenstern, B. (2004). AUGUSTUS: A web server for gene finding in eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 32(WEB SERVER ISS.), 309–312. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh379>

- Wang, C., & Wang, S. (2017). *Insect Pathogenic Fungi : Genomics , Molecular Interactions , and Genetic Improvements*. October 2016, 73–90.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-035509>
- Wolf, T., Shelest, V., Nath, N., & Shelest, E. (2016). CASSIS and SMIPS: Promoter-based prediction of secondary metabolite gene clusters in eukaryotic genomes. *Bioinformatics*, 32(8), 1138–1143. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv713>
- Yin, W., & Keller, N. P. (2011). Transcriptional Regulatory Elements in Fungal Secondary Metabolism. *Journal of Microbiology*, 49(3), 329–339.  
<https://doi.org/doi:10.1007/s12275-011-1009-1>
- Zhang, L., Fasoyin, O. E., Molnár, I., & Xu, Y. (2020). Secondary metabolites from hypocrealean entomopathogenic fungi: Novel bioactive compounds. *Natural Product Reports*, 37(9), 1181–1206. <https://doi.org/10.1039/c9np00065h>

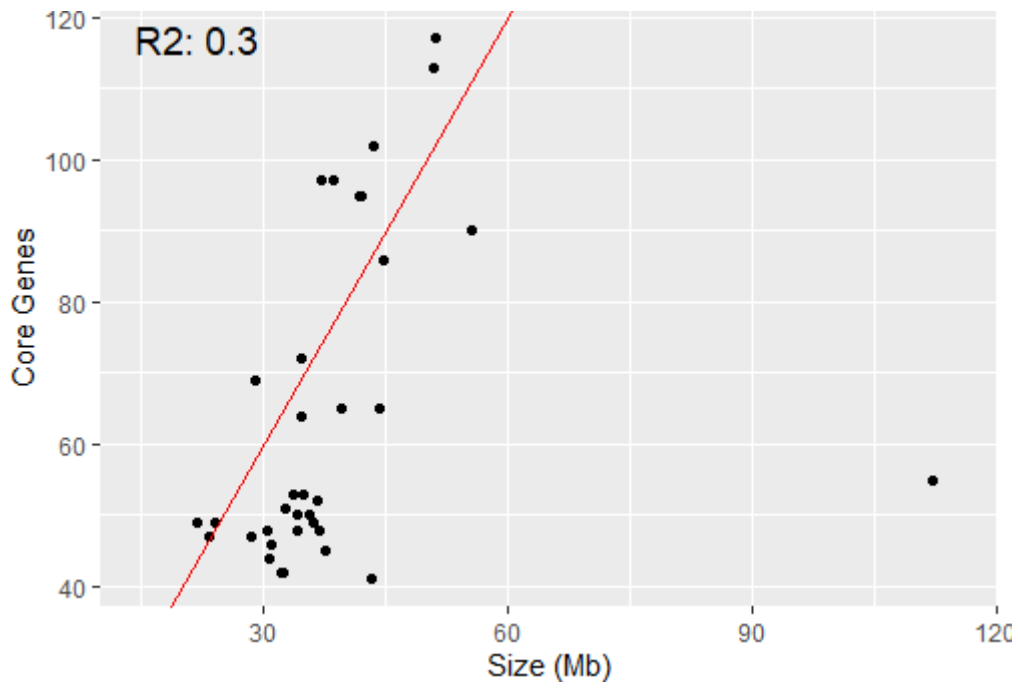
## BUSCO Assessment Results



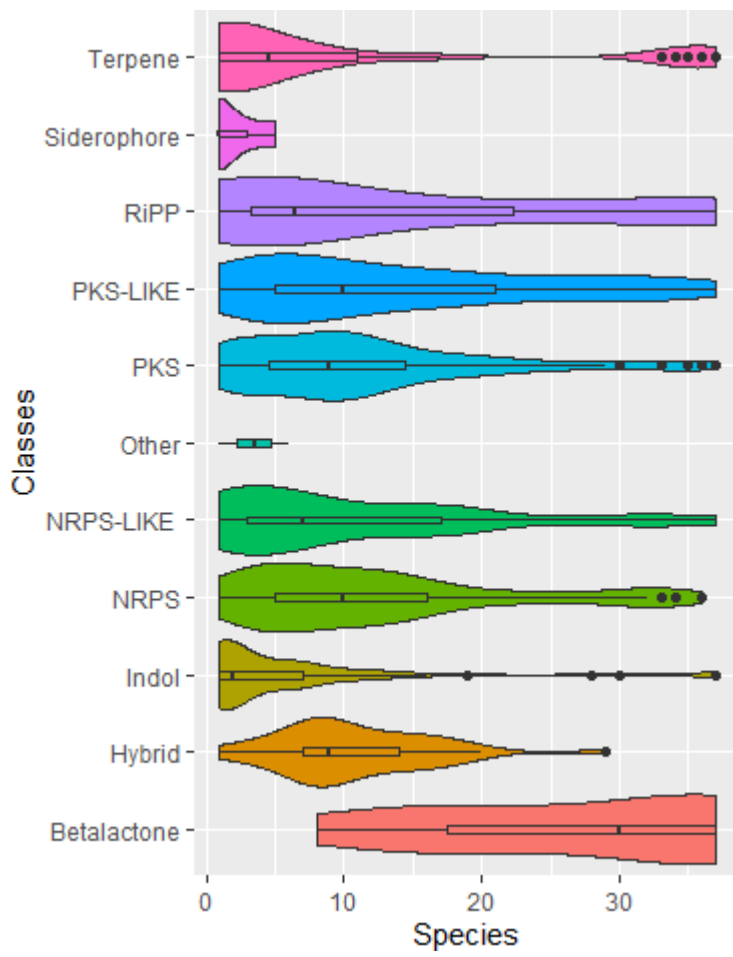
**FIGURE 1: BUSCO assessment results.** Full genome sequences were analyzed using BUSCO with the fungal definitions. In each bar there is the complete BUSCO value, where C: = complete BUSCOs; S: = Complete and single-copy BUSCOs; D: = Complete and duplicated BUSCOs; F: = Fragmented BUSCOs; M: = Missing BUSCOs; n: = Total BUSCO groups searched. THE, *Torrubiella hemipterigena*; PLI, *Purpureocillium lilacinum*; PHE, *Paecilomyces hepiali*; PCH, *Pochonia chlamydosporia*; OUN, *Ophiocordyceps unilateralis*; OAU, *Ophiocordyceps australis*; OSI, *Ophiocordyceps sinensis*; OPO, *Ophiocordyceps polyrhachis-furcata*; OCA, *Ophiocordyceps camponoti-rufipedis*; MRO, *Metarhizium robertsii*; MRI, *Metarhizium rileyi*; MMA, *Metarhizium majus*; MLI, *Moelleriella libera*; MGU, *Metarhizium guizhouense*; MBR, *Metarhizium brunneum*; MAN, *Metarhizium anisopliae*; MAL, *Metarhizium album*; MAC, *Metarhizium acridum*; LPS, *Lecanicillium psalliotae*; LFU, *Lecanicillium fungicola*; HTH, *Hirsutella thompsonii*; HSI, *Hypocrella siamensis*; HRH, *Hirsutella rhossiliensis*; HMI, *Hirsutella minnesotensis*; CTE, *Cordyceps tenuipes*; CRO, *Clonostachys rosea*; CPR, *Cordyceps pruinosa*; CMI, *Cordyceps militaris*; CJA, *Cordyceps javanica*; CFU, *Cordyceps fumosorosea*; CFA, *Cordyceps farinose*; CCO, *Cordyceps confragosa*; CCI, *Cordyceps cicadae*; BRU, *Beauveria rudraprayagi*; BPS, *Beauveria pseudobassiana*; BBR, *Beauveria brongniartii*; BBA, *Beauveria bassiana*.



**FIGURE 2: Putative BGCs identified in each species.** The full set of genomes were analyzed and the BGCs identified were plotted according to the species. THE, *Torrubiella hemipterigena*; PLI, *Purpureocillium lilacinum*; PHE, *Paecilomyces hepiali*; PCH, *Pochonia chlamydosporia*; OUN, *Ophiocordyceps unilateralis*; OAU, *Ophiocordyceps australis*; OSI, *Ophiocordyceps sinensis*; OPO, *Ophiocordyceps polyrhachis-furcata*; OCA, *Ophiocordyceps camponoti-rufipedis*; MRO, *Metarhizium robertsii*; MRI, *Metarhizium rileyi*; MMA, *Metarhizium majus*; MLI, *Moelleriella libera*; MGU, *Metarhizium guizhouense*; MBR, *Metarhizium brunneum*; MAN, *Metarhizium anisopliae*; MAL, *Metarhizium album*; MAC, *Metarhizium acridum*; LPS, *Lecanicillium psalliotae*; LFU, *Lecanicillium fungicola*; HTH, *Hirsutella thompsonii*; HSI, *Hypocrella siamensis*; HRH, *Hirsutella rhossiliensis*; HMI, *Hirsutella minnesotensis*; CTE, *Cordyceps tenuipes*; CRO, *Clonostachys rosea*; CPR, *Cordyceps pruinosa*; CMI, *Cordyceps militaris*; CJA, *Cordyceps javanica*; CFU, *Cordyceps fumosorosea*; CFA, *Cordyceps farinose*; CCO, *Cordyceps confragosa*; CCI, *Cordyceps cicadae*; BRU, *Beauveria rudraprayagi*; BPS, *Beauveria pseudobassiana*; BBR, *Beauveria brongniartii*; BBA, *Beauveria bassiana*.



**FIGURE 3:** Fungal genome size do not impact the number of BGCs.



**FIGURE 4:** BGCs conservation between the investigated species

A.

	BBA	BBR	BPS	BRU	CRO	CCI	CCO	CFA	CFU	CJA	CMB	CPR	CTE	HMR	HRH	HTH	HSI	LFU	LPS	MAC	MAL	MAN	MBR	MGU	MMA	MRI	MRO	MLI	CAU	OCA	OFO	OSE	OUR	PHE	PCH	PLU	THE
SP-BjHalcov	08931			023111 011021		023111 011021	045021 010971	02871 03871 010271		021 040211 04401	059711		06041	02481 051221 03551	07431 07521	07701 07751	01811	02431	013201		02041	02321	05001 05071	011811 011871	015041	015041	08211	06571 06521	015411	04201	08341	036141	03331	042271	033751	082701	
MRPS-PKS.2														025871	098301	070751	081501	060221	05401	01141	06091	015461	015321	07741	024111		040031	050631		07271			021131	033441	050001	071501	
MRPS-PKS.4		012521							047401	08211	07951	060201		025871	07801 04301	070751			015461			015461	015321	07741	024111		040031					021131			071501		
MRPS-PKS.5	051121	027441		04411		013601	07311	050671	08471	043221	040041	01001	041901		01801				021501		08271											08571				08841	
MRPS-PKS.1			02511		022231	040021	043901						02511	09071		04751			060101			060101	010941	02701	09041		018021	018021			08561	03571			0115101		
MRPS-PKS.2	072201	02001	07441	02501				076531	07941	082201	092201	0110301			01801	014501		050301									02041	018021			08561	03571					
MRPS-PKS.5			02511		022231	040021			043901				02511	09071					060101				010941	02701	09041		018021	018021			08561	03571			0115101		
MRPS-PKS.1			024901					0101501		051211	093401				01801	014501		050301					035201			02041	02041						02781 05811 010441	08021		011501	
MRPS-PKS.2									08721	08721					01801	014501		050301				092741	010701	044101	089501	084411	084411		070311	015601				0119701		011501	
MRPS-PKS.2			02511			040021	043901						02511							09071					09041		018021	018021			08561	03571			0115101		



B.

	BBA	BBR	BPS	BRU	CRD	CCI	CCO	CFA	CFU	CJA	CMJ	CPR	CTE	HBI	HRH	HTH	HSI	LFU	LPS	MAC	MAL	MAN	MBR	MCU	NMA	MRI	MRO	MLJ	OUA	OCA	OPO	OSI	OUJ	PHE	PCH	PLI	THE
NRP598	074761 073631	074111 073631	070721 074421	072111 076601	071771 071531	072531 071611	071121 073171	071211	074740	072831	072531 071611	071121 073171	072511 070511	079111 074361	079111 074361	077651 076161	070781	074461	072481 070461	074821	074311	075081	077131	077311 070721	073321 071991	073511 073521 071791	073401	073081	070901 070761	070001	071941	075201 071611	074391	073211 070711	077711 071961	078831 076791	
NRP597	076321	073631	075901	072331	071731	071871	071121	072111	074731	072831	071871	071121	076981	075221	075971 070721	071731		074461	072481	074821	074311	077841	072291 070711	071991	073511 073521 071791	073401	073081	070901 070761	071321	074291	074291	075161	074391	071111	077981	076411 076791	
NRP514	070291	070801	070821 070711	073821	071531	075971	070901	070871	076871	072831 071611	075971	070901	075181	075121 071241	070021	074331	070781	073551	071461	070461	073581	071341 070461	077841	070391	073301	071791	073081	070901 070761		070201	074391	071111	077981	076411 076791	075411		
NRP5101	074621	075151	071561	075191	074561	071921	070081	074111	075241	070821	071921	070081	075181	074151	074151	077581	073551	074371	071151	070461	073581	071341 070461	077841	070391	073301	071791	073081	070901 070761	074061	074661	075161	074391	071111	077981	076411 076791	075411	
NRP526	078921	075061	072221	072411	074591	074111	075901	070871	076871	072831	075971	070901	075181	074151	074151	077581	073551	074371	071151	070461	073581	071341 070461	077841	070391	073301	071791	073081	070901 070761	074061	074661	075161	074391	071111	077981	076411 076791	075411	
NRP511	070211	071201	070991	074581	073341	070501	070811	074311	074411	070721	070501	070811	071081	074531	071931	072891	071311	078031	077021	070571	074371	075031	0718621	077221	0714661	070311	074371	073511 073521 071791	074441	071511	074311	074311	071511	074061	074311	070751	
NRP57	076321	073631	075901	072331	071731	071871	071121	072111	074731	072831	071871	071121	076981	075221	075971 070721	071731		074461	072481	074821	074311	077841	072291 070711	071991	073511 073521 071791	073401	073081	070901 070761	071321	074291	074291	075161	074391	071111	077981	076411 076791	075411
NRP55	078921	075071	073221	072401	074581	074111	075911	070871	076881	072831	075981	070911	075181	074151	074151	077581	073551	074371	071151	070461	073581	071341 070461	077841	070391	073301	071791	073081	070901 070761	074061	074661	075161	074391	071111	077981	076411 076791	075411	
NRP520	078921	077921	074421	078401	078771	071461	073141	072741	075371	073141	071461	073141	072741	072741	072741	071441	073371	071441	071441	073371	071011	075341	074371	071351	074511	071041	076591	072101	072201	074321	072081	0702761	070081	077981	076411 076791	075411	
NRP58	078921	075061	073221	072411	074591	074111	075911	070871	076881	072831	075981	070911	075181	074151	074151	077581	073551	074371	071151	070461	073581	071341 070461	077841	070391	073301	071791	073081	070901 070761	074061	074661	075161	074391	071111	077981	076411 076791	075411	

C.

	IBA	IBR	BPS	BRU	CRD	CCI	CCO	CFA	CFU	CJA	CMI	CPR	CTE	HBI	HRH	HTH	HSI	LFU	LPS	MAC	MAL	MAN	MBR	MCU	NMA	MRI	MRO	MLJ	OUA	OCA	OPO	OSI	OJN	PHE	PCH	PLI	THE
PKS29	049715	048301	054031	053091	07590	063041	067131	025621	062331	020381	017171	0109321	035241	039121	055991	016971	050641	0115511	013691	027991	016481	042241	057941	058451	051991	051891	052371	053371	020191	01291	054001	074181	0102541	0121391	047701	079931	
PKS11	059601	012831	03271	011491	098331	086951	08891	04381	040781	07201	032711	088401	055321	025391	07521	039401	046031	082331	014671	06741	099131	059981	0103921	0110131	0100231	052731	052341	020791	027731	01971	058181	025411	069271	011721	085441		
PKS31	078715	039301	034021	068181	068791	04171	064141	059921	059921	04431	029421	0104641	051091	029761	075631	038101	045391	088301	073991	070291	087191	039601	019741	088321	0115511	0107221	039951	024111	039951	072211	071281	05431	038901	0131901	05051		
PKS22	048715	062781	051281	0109611	044751	048971	054991	039221	055071	083301	091431	075901	074421	025221	052371	07391	058321	073241	02171	040201		01421	079311	032241	048011	07791	044681	064491	023961	075881	023101	0101021	045671	03771	05301		
PKS28	044581	068481	040571	086691	077441	057561	045141	054171	0102781	0431	066331		09391	089591	0100491	051901	082061		036191	047051	045211	078741	058661	078741	0113381	07891	050321	070741	065441	057261	052081	052431	010701	060161	015301		
PKS59	010001	07231	052201	072211	09181	059001	011461	03191		086211			025971	051761	06651	05911	046031	052331	052431	011541	034131	075291	072041	077841	050201	034221	016201	02871	024211	0160491	044711	021481	033841	037891	03981		
PKS51	059601	03261	059831		0148441	08951	08891	029991	040781	04791	032711	033841	055321	025041	039911	015491	042291	06681	014671		05441	0101021	0101041	033601		05441	054331	058131	010341	010341	0100321	0100411	0100411	0100411	011721	050441	
PKS2	010001	054391	068771	072211	0183391	071031	062271	04681	064381	018901	024111	05121	061431	064441	081241	056601	081131	0117811	010071		067961	056031		023091	043111	015041	04481	074381	0231	044411	072881	0108411	0100541	06081	07841		
PKS30			012521	051191	090661	087461	033011	03191	047401	086211	076981	060261		025971	088381	070791	081591		054091	011541	060991	015481	019521	077841	040311	020881	056951		072771		021131	033841	050601	07151			
PKS37	010001	054391	068771	072211	015431	071031	062271	04681	047401	018901	024111	05121	061431	0103811	086691	051471	0117811	010071							023091	011431	050121	018111	0231	093811	036031	0108411	024301		085441		

D.

	BBA	BBR	BPS	BRU	CRU	CCI	CCO	CFA	CFU	CIA	CMW	CPK	CTE	HML	HRH	HTH	HSI	LFU	LPS	MAC	MAL	MAN	MBR	MOU	MMA	MRI	MRO	MLI	OUU	OCA	OPO	OSI	OUN	PHE	PCH	PLI	THE
TerpeneA	952420	979660	933630	982710	911220	972180	95460	97430	93020	94520	97560	97020	91740	92410	93070	92840	913740	931150	95590	93370	95740	94920	93920	97220	93240	92350	92340	94470	97330	946180	932640	931660	958560	96690	997180	9100780	935000
TerpeneB	990730	943730	94320	93010	94530	93910	94840	97330	97120	99030	93840	91530	91440	94830	93960	95720	92420	919440	94470	97170	96740	97960	93730	92010	93040	96290	96560	94220	94990	991350	94420	94410	950080	93110	92770	940760	99580
TerpeneC	990730	943730	94320	93010	94530	93910	94840	97330	97120	99030	93840	91530	91440	94830	93960	95720	92420	919440	94470	97170	96740	97960	93730	92010	93040	96290	96560	94220	94990	991350	94420	94410	950080	93110	92770	940760	99580
TerpeneD	96440	98220	98520	96700	92810	94760	92840	97380	94320	99720	995190	918420	95010	96680	95370	944150	910590	940480	97030	94320	948160	97040	924680	938130	924420	94440	91880	97490	991350	924120	922020	920560	95380	95880	9102030	940760	99580
TerpeneE	990730	943730	94320	93010	94530	93910	94840	97330	97120	99030	93840	91530	91440	94830	93960	95720	92420	919440	94470	97170	96740	97960	93730	92010	93040	96290	96560	94220	94990	991350	94420	94410	950080	93110	92770	940760	99580
TerpeneF	952420	979660	933630	982710	911220	972180	95460	97430	93020	94520	97560	97020	91740	92410	93070	92840	913740	931150	95590	93370	95740	94920	93920	97220	93240	92350	92340	94470	97330	946180	932640	931660	958560	96690	997180	9100780	935000
TerpeneG	993810	920860	94070	94990	92360	93810	93210	91660	94410	99300	97730	95620	92530	97420	94840	95340	98160	914880	910340	97970	97960	99160	93300	91850	96670	96920	97040	95760	94410	92400	922020	940460	94260	99000	912660	995180	
TerpeneH	94490	98220	98520	96700	92810	94760	92840	97380	94320	99720	995190	918420	95010	96680	95370	944150	910590	940480	97030	94320	948160	97040	924680	938130	924420	94440	91880	97490	991350	924120	922020	920560	95380	95880	9102030	940760	99580
TerpeneI	94490	98220	98520	96700	92810	94760	92840	97380	94320	99720	995190	918420	95010	96680	95370	944150	910590	940480	97030	94320	948160	97040	924680	938130	924420	94440	91880	97490	991350	924120	922020	920560	95380	95880	9102030	940760	99580
TerpeneJ	94490	98220	98520	96700	92810	94760	92840	97380	94320	99720	995190	918420	95010	96680	95370	944150	910590	940480	97030	94320	948160	97040	924680	938130	924420	94440	91880	97490	991350	924120	922020	920560	95380	95880	9102030	940760	99580

Г.

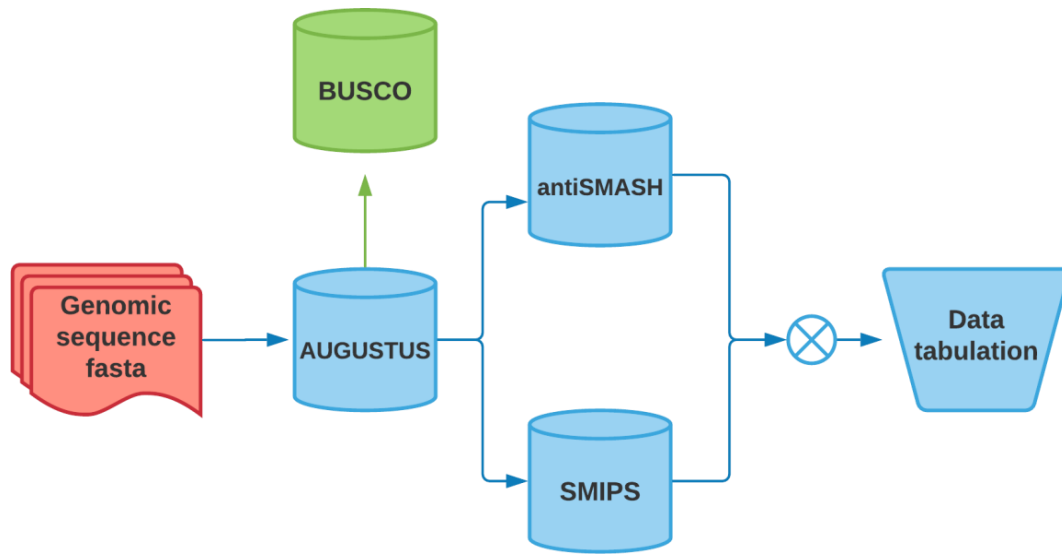
	BBA	BBR	BPS	BRU	CRQ	CCI	CCO	CFA	CFU	CJA	CMB	CPR	CTE	HBI	HRH	HTH	HSI	LFU	LFS	MAC	MAL	MAN	MBR	MOLU	MMA	MRI	MRO	MLI	CAU	CCA	OPO	OSI	QAIN	PHE	PCH	PLI	THE
DMATS9	g6041	g82711	g73761	g88951	g127811	g443561	g136611	g154711	g95911	g228911	g814311	g442411	g569511	g718111	g746211	g460411	g759611	g759611	g479211	g243611	g431411	g301311	g719411	g759611	g57911	g492211	g602111	g777011	g791211	g042711	g57811	g442911	g227011	g150111	g880211	g819111	g433311
DMATS3	g6041	g82711	g73761	g88951	g127811	g443561	g136611	g154711	g95911	g228911	g814311	g442411	g569511	g718111	g746211	g460411	g759611	g759611	g479211	g243611	g431411	g301311	g719411	g759611	g57911	g492211	g602111	g777011	g791211	g042711	g57811	g442911	g227011	g150111	g880211	g819111	g433311
DMATS2	g100471	g586611	g182011	g772911	g1201411	g266411	g759911	g403811	g354311	g882711	g740611	g529011	g1513611	g959111	g553611	g892111	g88811	g777711	g1224811	g813011	g814211	g716711	g955211	g830211	g88811	g777711	g770111	g715111	g717111	g444511	g448711	g414811	g841111	g325011	g124411	g407611	g133811
DMATS8	g100471				g1201411	g266411	g759911	g354311				g529011	g1513611	g959111	g553611	g892111	g88811	g777711	g1224811	g813011	g814211	g716711	g955211	g830211	g88811	g777711	g770111	g715111	g444511	g448711	g414811	g841111	g325011	g124411	g407611	g133811	
DMATS26	g100471				g1201411	g266411	g759911	g354311				g529011	g1513611	g959111	g553611	g892111	g88811	g777711	g1224811	g813011	g814211	g716711	g955211	g830211	g88811	g777711	g770111	g715111	g444511	g448711	g414811	g841111	g325011	g124411	g407611	g133811	
DMATS32	g885611	g810111	g882111	g581411			g277211	g407411		g668111			g843411		g888111	g48811	g303811	g796011						g796011			g1127111	g109111	g413611	g571611	g672111	g497411					
Imode10																		g207111		g721611	g873811	g796711	g307111	g84011	g632111	g605411	g42111		g614111	g447011		g200011					
DMATS35															g207111	g796711	g422011	g207111	g796711	g873811	g796711	g307111	g84011	g632111	g605411	g42111		g614111	g447011								
Imode9															g207111	g796711	g422011	g207111	g796711	g873811	g796711	g307111	g84011	g632111	g605411	g42111		g614111	g447011								
DMATS1	g885611	g810111	g882111	g581411			g277211	g407411		g668111			g843411		g888111	g48811	g303811	g796411	g531611	g585711	g7946211			g796411	g531611	g1806811		g512011		g682811	g847811						

**FIGURE 5:** Top-10 conserved BGCs of Hybrids (A); NRPSs (B); PKSs (C); Terpenes (D); Indols (E).

**Additional Table 1**

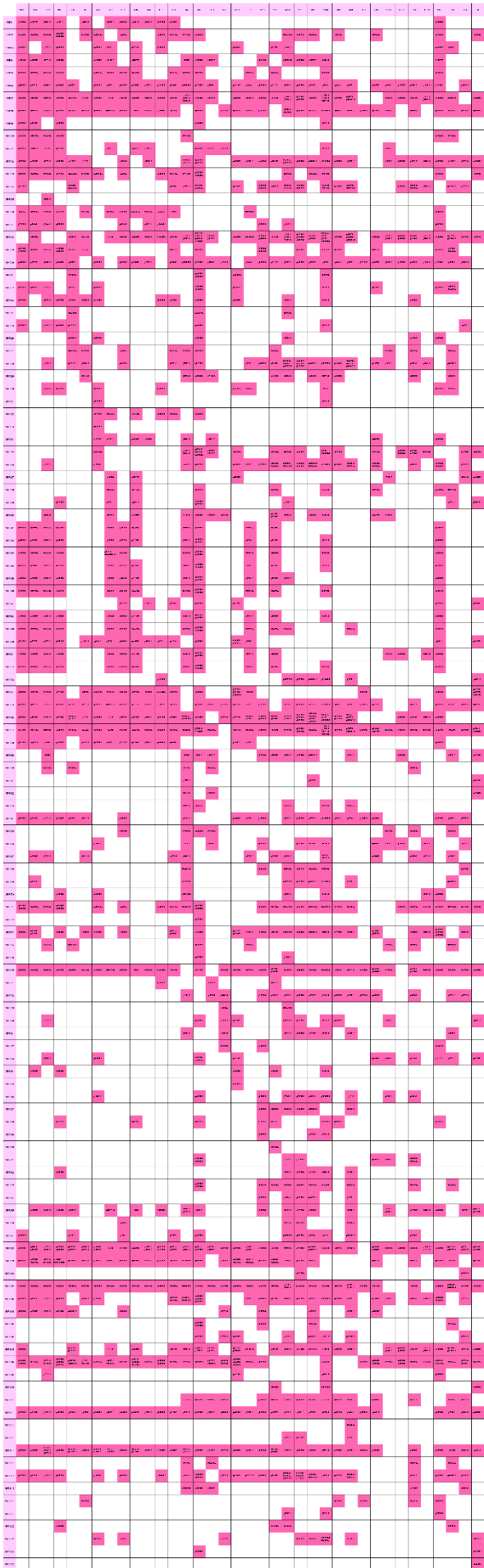
<b>Accession Number</b>	<b>Species</b>	<b>Strain / Isolate</b>
GCA_000280675.1	<i>Beauveria bassiana</i>	ARSEF 2860
GCA_001636735.1	<i>Beauveria brongniartii</i>	RCEF 3172
GCA_003267905.1	<i>Beauveria pseudobassiana</i>	KACC 47484
GCA_000733645.1	<i>Beauveria rudraprayagi</i>	MTCC 8017
GCA_000963775.2	<i>Clonostachys rosea</i>	67-1
GCA_002968875.1	<i>Cordyceps cicadae</i>	CC02
GCA_001636795.1	<i>Cordyceps confragosa</i>	RCEF 1005
GCA_000733625.1	<i>Cordyceps farinosa</i>	MTCC 4114
GCA_001636725.1	<i>Cordyceps fumosorosea</i>	ARSEF 2679
GCA_006981985.1	<i>Cordyceps javanica</i>	IJ1G
GCA_000225605.1	<i>Cordyceps militaris</i>	CM01
GCA_003025255.1	<i>Cordyceps pruinosa</i>	KACC 44470
GCA_003025305.1	<i>Cordyceps tenuipes</i>	KACC 47485
GCA_000956045.1	<i>Hirsutella minnesotensis</i>	3608
GCA_004142005.1	<i>Hirsutella rhossiliensis</i>	OWVT-1
GCA_000472145.1	<i>Hirsutella thompsonii</i>	MTCC3556
GCA_000731825.1	<i>Hypocrella siamensis</i>	MTCC 10142
GCA_900169235.1	<i>Lecanicillium fungicola</i>	150-1
GCA_002796755.1	<i>Lecanicillium psalliotae</i>	HWLR35
GCA_000187405.1	<i>Metarhizium acridum</i>	CQMa 102
GCA_000804445.1	<i>Metarhizium album</i>	ARSEF 1941
GCA_000739145.1	<i>Metarhizium anisopliae</i>	E6
GCA_000814965.1	<i>Metarhizium brunneum</i>	ARSEF 3297
GCA_000814955.1	<i>Metarhizium guizhouense</i>	ARSEF 977
GCA_000814945.1	<i>Metarhizium majus</i>	ARSEF 297
GCA_001636745.1	<i>Metarhizium rileyi</i>	RCEF 4871
GCA_000187425.2	<i>Metarhizium robertsii</i>	ARSEF 23
GCA_001636675.1	<i>Moelleriella libera</i>	RCEF 2490
GCA_002591415.1	<i>Ophiocordyceps australis</i>	Map64
GCA_002591395.1	<i>Ophiocordyceps camponoti-rufipedis</i>	Map16
GCA_001633055.2	<i>Ophiocordyceps polyrhachis-furcata</i>	BCC 54312
GCA_002077885.1	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>	1929
GCA_001272575.2	<i>Ophiocordyceps unilateralis</i>	SC16a
GCA_001455915.2	<i>Paecilomyces hepiali</i>	FENG
GCA_001653235.2	<i>Pochonia chlamydosporia</i>	170
GCA_003144605.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	36-1
GCA_000825705.1	<i>Torrubiella hemipterigena</i>	

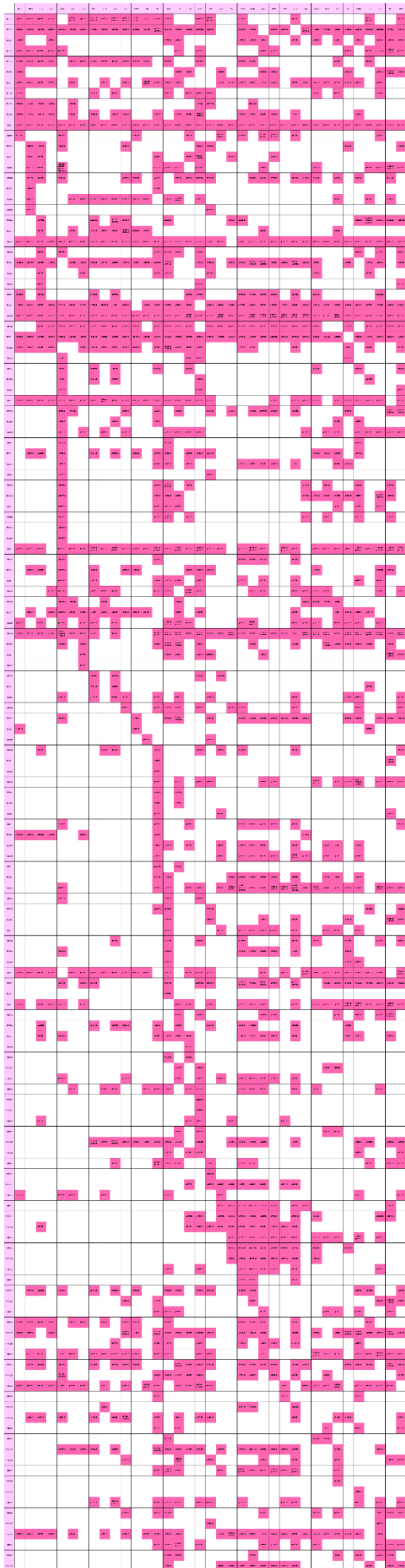
Additional Figure 1

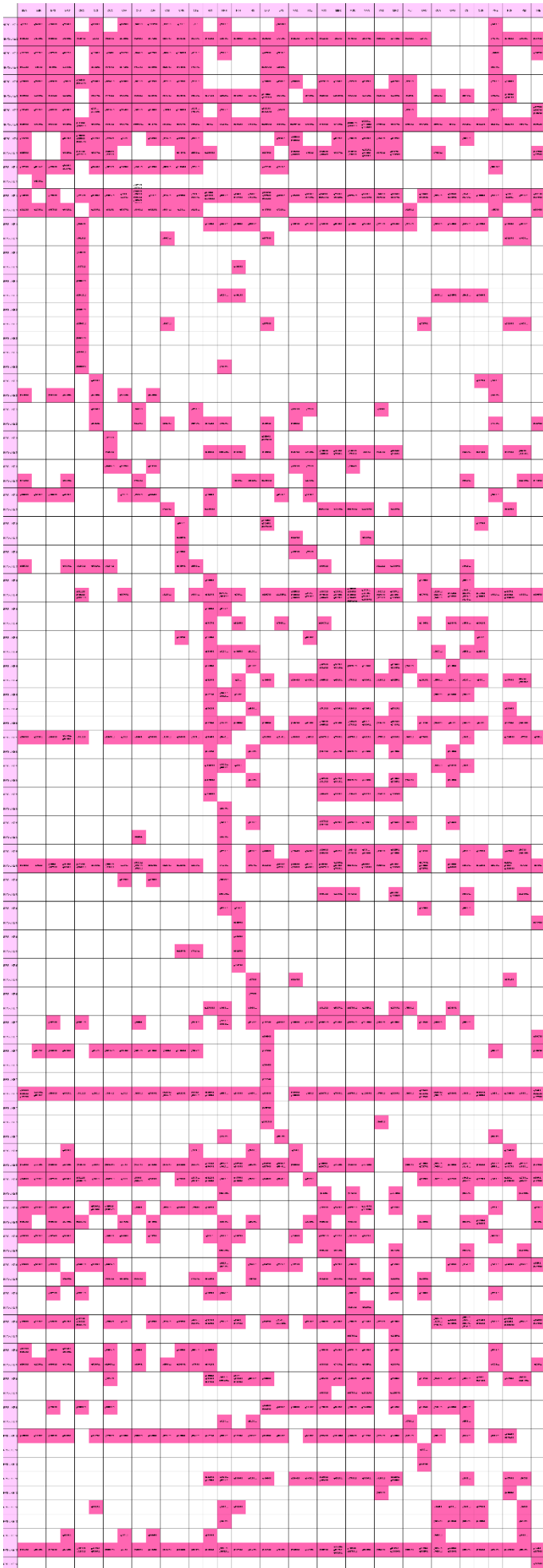




















## 5 DISCUSSÃO

O controle biológico vem se mostrando uma importante estratégia alternativa que visa reduzir a dependência de defensivos químicos, mantendo a produtividade agrícola e, conseqüentemente, econômica. O controle biológico é ambientalmente menos impactante e pode ser utilizado no controle de espécies de artrópodes resistentes aos inseticidas comumente empregados (Peshin & Dhawan, 2009). Os fungos entomopatogênicos, considerados importantes patógenos naturais de artrópodes, apresentam um potencial econômico crescente como agentes de controle biológico já sendo empregados em lavouras para o controle de artrópodes-praga (Faria & Wraight, 2007; Schrank & Vainstein, 2010).

O processo de infecção do hospedeiro artrópode pelo fungo é composto por uma série de etapas que culminará na morte do hospedeiro (Wang & Wang, 2017). Esse processo é dependente de uma grande diversidade de determinantes de virulência, como proteínas e metabólitos secundários (Keller, 2019; Wang & Wang, 2017; Zhang et al., 2020). No entanto, a grande maioria dos determinantes já caracterizados para estas espécies é de origem proteica, sendo poucos metabólitos secundários com potencial inseticida já relatados e caracterizados (Wang & Wang, 2017). Considerando que a ordem Hypocreales abriga inúmeros fungos entomopatogênicos capazes de produzir moléculas bioativas (Zhang et al., 2020), nós realizamos uma análise de genômica comparativa com o objetivo de identificar agrupamentos gênicos responsáveis pela biossíntese de metabólitos secundários no genoma de 37 espécies de fungos entomopatogênicos da ordem Hypocreales.

Considerando que o sequenciamento gera reads relativamente curtos, tornando a montagem do genoma bastante desafiador, é importante fazer um controle de qualidade, para saber as potenciais limitações que serão enfrentadas (Paszkiwicz & Studholme, 2010; Simão et al., 2015). Nesse sentido, foi avaliado, de forma quantitativa, a montagem do genoma e anotação das 37 sequências genômicas através da ferramenta BUSCO (Simão et al., 2015). Com exceção de 3 sequências (*Cordyceps pruinosae*, *Ophiocordyceps camponotirufipedis* e *Ophiocordyceps sinensis*), todas obtiveram um valor de completude



maior ou igual a 95,0%, indicando que cada sequência gênica avaliada representa uma proporção significativa do genoma real, não afetando a análise da conservação de agrupamentos gênicos.

A identificação dos potenciais agrupamentos gênicos envolvidos na síntese dos MSs foi realizada utilizando as ferramentas antiSMASH e SMIPS (Wolf et al., 2016). No total, foram identificados 2348 potenciais agrupamentos nas 37 espécies avaliadas, sendo que os agrupamentos mais abundantes nos genomas são aqueles pertencentes às classes PKS, NRPS, TERP e INDOLS que são, de fato, as classes de MSs mais comumente encontrados em fungos do filo Ascomycota (Inglis et al., 2013; Keller, 2019). Além disso, de acordo com o perfil de agrupamentos identificados em cada uma das espécies, elas são potencialmente capazes de sintetizar um perfil único de MSs, o que pode ser um reflexo das distintas estratégias de adaptação observadas nessas espécies (Bills & Gloer, 2017).

A conservação dos agrupamentos identificados foi avaliada utilizando o BLAST (Altschul et al., 1997), na qual foi observada uma variação da conservação dos agrupamentos entre as diferentes classes de metabólitos secundários e dentro das classes de metabólitos secundários, sendo identificados tanto agrupamentos órfãos, quanto agrupamentos totalmente conservados, o que destaca a potencial quimiodiversidade dessas espécies de fungos. Um fato interessante é que pelo menos um agrupamento de cada categoria é conservado em todas as espécies analisadas, exceto para sideróforos, NRPSs e híbridos, o que sugere que esses agrupamentos possuem um papel importante nos distintos estilos de vida desses fungos e podem produzir compostos importantes para a manutenção do ciclo de vida e infecção desses fungos.

É notório que durante toda o processo de infecção, o fungo produz uma série de metabólitos secundários capazes de auxiliar na infecção e colonização do hospedeiro, e que esses compostos bioativos podem estar envolvidos na virulência e assimilação de nutrientes (Bills & Gloer, 2017; Chandler, 2017). Considerando que alguns agrupamentos estão conservados na maioria das 37 espécies de fungos entomopatogênicos da ordem Hypocreales eles podem

representar uma fonte de moléculas importantes para aplicação no desenvolvimento de novos inseticidas e, portanto, sua melhor investigação pode auxiliar em implementações mais eficazes de estratégias de controle biológico.

Em relação a metodologia empregada para a análise, de modo geral, a mesma se bem estruturada. Realizamos uma etapa fundamental de controle da qualidade das sequências genômicas e utilizamos ferramentas de identificação de agrupamentos gênicos que são amplamente utilizadas para esse fim (Graham-taylor et al., 2020; Sbaraini et al., 2016; Simão et al., 2015). Entretanto, tais ferramentas são baseadas em algoritmos que dependem da presença de domínios conservados no *backbone* e, além disso, elas, geralmente, não conseguem diferenciar agrupamentos muito próximos, combinando-os em um único (Blin et al., 2019; Umemura et al., 2015; Wolf et al., 2016). Como alternativa, existem ferramentas que são capazes, através da utilização de dados de transcriptômica, identificar genes co-regulados, permitindo a identificação de agrupamentos independentemente da presença do *backbone*, no entanto, esses dados não estão disponíveis para todas as espécies avaliadas (Umemura et al., 2015). Idealmente, sabendo que a síntese desses compostos é bastante regulada e depende de fatores específicos, a melhor abordagem para a determinação de agrupamentos seria a combinação entre as ferramentas baseadas em domínios conservados e as ferramentas baseadas em dados de transcriptômica (Keller, 2019).

## 6 REFERÊNCIAS

- Abbas, G., Hassan, N., Farhan, M., Haq, I., & Karar, H. (2015). Effect of Selected Insecticides on *Helicoverpa armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) on Tomato (*Lycopersicon esculentum* Miller) and Their Successful Management. *Advances in Entomology*, 03(01), 16–23. <https://doi.org/10.4236/ae.2015.31003>
- Abolins, S., Thind, B., Jackson, V., Luke, B., Moore, D., Wall, R., & Taylor, M. A. (2007). Control of the sheep scab mite *Psoroptes ovis* in vivo and in vitro using fungal pathogens. *Veterinary Parasitology*, 148(3–4), 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.06.008>
- Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 1–12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Althani, A. A., Marei, H. E., Hamdi, W. S., Nasrallah, G. K., El Zowalaty, M. E., Al Khodor, S., Al-Asmakh, M., Abdel-Aziz, H., & Cenciarelli, C. (2016). Human Microbiome and its Association With Health and Diseases. *Journal of Cellular Physiology*, 231(8), 1688–1694. <https://doi.org/10.1002/jcp.25284>
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/genetics/156.4.1997>
- Andrade-Domínguez, A., Salazar, E., Del Carmen Vargas-Lagunas, M., Kolter, R., & Encarnación, S. (2014). Eco-evolutionary feedbacks drive species interactions. *ISME Journal*, 8(5), 1041–1054. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.208>
- Badet, T., Peyraud, R., Mbengue, M., Navaud, O., Derbyshire, M., Oliver, R. P., Barbacci, A., & Raffaele, S. (2017). Codon optimization underpins generalist parasitism in fungi. *ELife*, 6, 1–35. <https://doi.org/10.7554/eLife.22472>
- Bennett, J. W., & Chung, K. (2001). Alexander Fleming and the Discovery of Penicillin. 49.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8), 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
- Bills, G. F., & Gloer, J. B. (2017). Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. *The Fungal Kingdom*, 1087–1119. <https://doi.org/10.1128/9781555819583.ch54>
- Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Lee, S. Y., Medema, M. H., & Weber, T. (2019). AntiSMASH 5.0: Updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W81–W87. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz310>
- Bradshaw, C. J. A., Leroy, B., Bellard, C., Roiz, D., Albert, C., Fournier, A., Barbet-Massin, M., Salles, J. M., Simard, F., & Courchamp, F. (2016).

- Massive yet grossly underestimated global costs of invasive insects. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms12986>
- Cantrell, S. A., Dianese, J. C., Fell, J., Gunde-Cimerman, N., & Zalar, P. (2011). Unusual fungal niches. *Mycologia*, 103(6), 1161–1174. <https://doi.org/10.3852/11-108>
- Chandler, D. (2017). Basic and Applied Research on Entomopathogenic Fungi. In *Microbial Control of Insect and Mite Pests: From Theory to Practice*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803527-6.00005-6>
- Charnley, A. K. (2007). Entomopathogenic Fungi and Their Role in Pest Control. *Environmental and Microbial Relationships*, 159–187. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-71840-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-540-71840-6_10)
- Crowther, T. W., Boddy, L., & Hefin Jones, T. (2012). Functional and ecological consequences of saprotrophic fungus-grazer interactions. *ISME Journal*, 6(11), 1992–2001. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.53>
- Dunn, C. J., Wagstaff, A. J., Perry, C. M., Plosker, G. L., Goa, K. L., Columbia, B., Fisher, R. A., Division, T., Colledge, M., & Frei, U. (2001). Cyclosporin: An Updated Review of the Pharmacokinetic Properties, Clinical Efficacy and Tolerability of a Microemulsion-Based Formulation ( Neoral® ) 1 in Organ Transplantation. 61(13), 1957–2016.
- Eckstein, B., Ribeiro, B. M., Soares, C. M. S., Pires, C. S. S., Dolinski, C. de M., Carvalho, D. D. C., Jorge, D. M., de Macedo, D. M., Navia, D., Magalhães, D. M., Marques, E., Sujii, E. R., Guatimosim, E., Fontes, E. M. G., Martins, É. S., Harterreiten-Souza, É. S., da Silva, F. Á., Valicente, F. H., Nachtigal, G. de F., ... Monteiro, T. S. A. (2020). Controle Biológico de Pragas da Agricultura. In E. M. G. Fontes & M. C. Valadares-Inglis (Eds.), *Embrapa* (1a, Vol. 1, Issue 1). Embrapa. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cirp.2016.06.001> <http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2016.12.055> <https://doi.org/10.1016/j.ijfatigue.2019.02.006> <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.04.024> <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.12.7252> <http://dx.doi.org/10.1016/j.cirp.2016.06.001>
- Edwards, E., Toft, R., Joice, N., & Westbrooke, I. (2017). The efficacy of Vespex® wasp bait to control *Vespula* species (Hymenoptera: Vespidae) in New Zealand. *International Journal of Pest Management*, 63(3), 266–272. <https://doi.org/10.1080/09670874.2017.1308581>
- Faria, M. R. d., & Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3), 237–256. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>
- Fonseca, S., Radhakrishnan, D., Prasad, K., & Chini, A. (2017). Fungal Production and Manipulation of Plant Hormones. *Current Medicinal Chemistry*, 25(2), 253–267. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170314150827>
- Gadd, G. M. (2017). The Geomycology of Elemental Cycling and Transformations in the Environment. *The Fungal Kingdom*, 369–386. <https://doi.org/10.1128/9781555819583.ch16>

- Garc, C., Dom, R., & Kosalkov, K. (2018). Transcription Factors Controlling Primary and Secondary Metabolism in Filamentous Fungi: The  $\beta$ -Lactam Paradigm. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020047>
- Golomb, B. A., & Evans, M. A. (2010). Statin Adverse Effects: A Review of the Literature and Evidence for a Mitochondrial Mechanism. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 8(6), 373–418.
- Graham-taylor, C., Kamphuis, L. G., & Derbyshire, M. C. (2020). A detailed in silico analysis of secondary metabolite biosynthesis clusters in the genome of the broad host range plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. 1–20.
- Hertweck, C. (2009). The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angewandte Chemie - International Edition*, 48(26), 4688–4716. <https://doi.org/10.1002/anie.200806121>
- Hughes, D. P., & Ara, J. P. M. (2016). Diversity of Entomopathogenic Fungi: Which Groups Conquered the Insect Body? 94, 1–39. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.01.001>
- Humber, R. A. (2008). Evolution of entomopathogenicity in fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3), 262–266. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.02.017>
- Inglis, D. O., Binkley, J., Skrzypek, M. S., Arnaud, M. B., Cerqueira, G. C., Shah, P., Wymore, F., Wortman, J. R., & Sherlock, G. (2013). Comprehensive annotation of secondary metabolite biosynthetic genes and gene clusters of *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *A. niger* and.
- Keller, N. P. (2015). Translating biosynthetic gene clusters into fungal armor and weaponry. *Nature Chemical Biology*, 11(9), 671–677. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1897>
- Keller, N. P. (2019). Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 167–180. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0121-1.Fungal>
- Keller, N. P., Turner, G., & Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism - From biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 3(12), 937–947. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1286>
- Kendrick, B. (2011). Fungi: Ecological Importance and Impact on Humans. 1–5. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000369.pub2>
- Kensler, T. W., Roebuck, B. D., Wogan, G. N., & Groopman, J. D. (2011). Aflatoxin: A 50-year Odyssey of mechanistic and translational toxicology. *Toxicological Sciences*, 120(SUPPL.1), 28–48. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq283>
- Krause, D. J., Kominek, J., Oplente, D. A., Shen, X. X., Zhou, X., Langdon, Q. K., DeVirgilio, J., Hulfachor, A. B., Kurtzman, C. P., Rokas, A., & Hittinger, C. T. (2018). Functional and evolutionary characterization of a secondary metabolite gene cluster in budding yeasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(43), 11030–11035. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806268115>

- Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M., & Goettel, M. S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 1–41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>
- Lanfranco, L., Bonfante, P., & Genre, A. (2017). The Mutualistic Interaction between Plants and Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *The Fungal Kingdom*, 727–747. <https://doi.org/10.1128/9781555819583.ch35>
- Liu, B. L., & Tzeng, Y. M. (2012). Development and applications of destruxins: A review. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1242–1254. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.10.006>
- Lovett, B., & Leger, R. J. S. T. (2017). The Insect Pathogens. 1–19.
- McLaughlin, G. M., & Dearden, P. K. (2019). Invasive insects: Management methods explored. *Journal of Insect Science*, 19(5). <https://doi.org/10.1093/jisesa/iez085>
- Molnár, I., Gibson, D. M., & Krasnoff, S. B. (2010). Secondary metabolites from entomopathogenic Hypocrealean fungi. *Natural Product Reports*, 27, 1241–1275. <https://doi.org/10.1039/c001459c>
- Morrison, V. A. (2006). Echinocandin antifungals: review and update. 325–342.
- Paszkiwicz, K., & Studholme, D. J. (2010). De novo assembly of short sequence reads. 11(5). <https://doi.org/10.1093/bib/bbq020>
- Peshin, R., & Dhawan, A. K. (2009). Integrated Pest Management: Innovation- Development Process. In *Journal of Materials Processing Technology* (Vol.1, Issue 1). New York Springer Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8992-3>
- Petersen, A. B., Rønne, M. H., Larsen, T. O., & Clausen, M. H. (2014). The chemistry of griseofulvin. *Chemical Reviews*, 114(24), 12088–12107. <https://doi.org/10.1021/cr400368e>
- Roy, H. E., Steinkraus, D. C., Eilenberg, J., Hajek, A. E., & Pell, J. K. (2006). Bizarre interactions and endgames: Entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annual Review of Entomology*, 51, 331–357. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.150941>
- Sabatini, M., Comba, S., Altabe, S., Recio-Balsells, A. I., Labadie, G. R., Takano, E., Gramajo, H., & Arabolaza, A. (2018). Biochemical characterization of the minimal domains of an iterative eukaryotic polyketide synthase. *FEBS Journal*, 285(23), 4494–4511. <https://doi.org/10.1111/febs.14675>
- Sbaraini, N., Bellini, R., Penteriche, A. B., Guedes, R. L. M., Garcia,

- A. W. A., Gerber, A. L., Vainstein, M. H., De Vasconcelos, A. T. R., Schrank, A., & Staats, C. C. (2019). Genome-wide DNA methylation analysis of *Metarhizium anisopliae* during tick mimicked infection condition. *BMC Genomics*, 20(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6220-1>
- Sbaraini, N., Lucas, R., Guedes, M., Andreis, F. C., Junges, Â., Morais, G. L. De, Vainstein, M. H., Tereza, A., Vasconcelos, R. De, & Schrank, A. (2016). Secondary metabolite gene clusters in the entomopathogen fungus *Metarhizium anisopliae*: genome identification and patterns of expression in a cuticle infection model. *BMC Genomics*, 17(Suppl 8). <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3067-6>
- Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2010). *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56(7), 1267–1274. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.008>
- Shah, P. A., & Pell, J. K. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5–6), 413–423. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1240-8>
- Shang, Y., Feng, P., & Wang, C. (2015). *Fungi That Infect Insects: Altering Host Behavior and Beyond*. 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005037>
- Shang, Y., Xiao, G., Zheng, P., Cen, K., Zhan, S., & Wang, C. (2016). Divergent and Convergent Evolution of Fungal Pathogenicity. 8(5), 1374–1387. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw082>
- Shin, T. Y., Lee, M. R., Park, S. E., Lee, S. J., Kim, W. J., & Kim, J. S. (2020). Pathogenesis-related genes of entomopathogenic fungi. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 105(4). <https://doi.org/10.1002/arch.21747>
- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31(19), 3210–3212. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv351>
- Stefanini, I. (2018). Yeast - insect associations: It takes guts. *May 2017*, 315–330. <https://doi.org/10.1002/yea.3309>
- Süssmuth, R. D., & Mainz, A. (2017). Nonribosomal Peptide Synthesis — Principles and Prospects Reviews. *Angewandte Chemie International Edition*, 56, 3770–3822. <https://doi.org/10.1002/anie.201609079>
- Tragust, S., Mitteregger, B., Barone, V., Konrad, M., Ugelvig, L. V., & Cremer, S. (2013). Ants disinfect fungus-exposed brood by oral uptake

- and spread of their poison. *Current Biology*, 23(1), 76–82.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.034>
- Tudi, M., Ruan, H. D., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., Chu, C., & Phung, D. T. (2021). Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(3), 1–24.  
<https://doi.org/10.3390/ijerph18031112>
- Umemura, M., Koike, H., & Machida, M. (2015). Motif-independent de novo detection of secondary metabolite gene clusters — toward identification from filamentous fungi. 6(May), 1–14.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00371>
- Walton, J. D., & Walton, J. D. (2000). Horizontal Gene Transfer and the Evolution of Secondary Metabolite Gene Clusters in Fung: An Hypothesis. 171, 167–171. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1224>
- Wang, B., & Qiu, Y. L. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, 16(5), 299–363. <https://doi.org/10.1007/s00572-005-0033-6>
- Wang, C., & Wang, S. (2017). Insect Pathogenic Fung: Genomics, Molecular Interactions, and Genetic Improvements. October 2016, 73–90. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-035509>
- Wang, Q., & Xu, L. (2012). Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: A short review. *Molecules*, 17(3), 2367–2377. <https://doi.org/10.3390/molecules17032367>
- Wolf, T., Shelest, V., Nath, N., & Shelest, E. (2016). CASSIS and SMIPS: Promoter-based prediction of secondary metabolite gene clusters in eukaryotic genomes. *Bioinformatics*, 32(8), 1138–1143. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv713>
- Xu, W., Gavia, D. J., Tang, Y., Angeles, L., Angeles, L., & Angeles, L. (2015). Biosynthesis of Fungal Indole Alkaloids. 31(10), 1474–1487. <https://doi.org/10.1039/c4np00073k>
- Yin, W., & Keller, N. P. (2011). Transcriptional Regulatory Elements in Fungal Secondary Metabolism. *Journal of Microbiology*, 49(3), 329–339. <https://doi.org/doi:10.1007/s12275-011-1009-1>
- Zhang, L., Fasoyin, O. E., Molnár, I., & Xu, Y. (2020). Secondary metabolites from hypocrealean entomopathogenic fungi: Novel bioactive compounds. *Natural Product Reports*, 37(9), 1181–1206. <https://doi.org/10.1039/c9np00065h>
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(6), 553–596. <https://doi.org/10.1007/s10541-007-9100-1>